

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 10 月 23 日 (23.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/087360 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12M 1/00, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/IB03/01368

(22) 国際出願日: 2003 年 4 月 14 日 (14.04.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-111132 2002 年 4 月 12 日 (12.04.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団  
法人大阪産業振興機構 (OSAKA INDUSTRIAL PRO-  
MOTION ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒540-0029 大阪  
府 大阪市 中央区本町橋 2 番 5 号 マイドームおおさ  
か内 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山崎 義光 (YA-  
MASAKI, Yoshimitsu) [JP/JP]; 〒662-0084 兵庫県 西宮  
市 樋之池町 2 7-1 5-1 0 3 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 松田 奈緒子, 外 (MATSUDA, Naoko et al.); 〒  
151-0053 東京都 渋谷区 代々木一丁目 1 9 番地 1 2 新  
代々木ビル 2 0 6 山の手合同国際特許事務所 Tokyo  
(JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受  
領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF JUDGING RISK OF ARTERIAL SCLEROSIS, METHOD OF MEASURING RISK OF ARTERIAL  
SCLEROSIS, MICROARRAY FOR JUDGING RISK OF ARTERIAL SCLEROSIS, DEVICE FOR JUDGING RISK OF ARTE-  
RIAL SCLEROSIS AND PROGRAM FOR JUDGING RISK OF ARTERIAL SCLEROSIS

(54) 発明の名称: 動脈硬化性疾患危険度判定方法、動脈硬化性疾患危険度測定方法、動脈硬化性疾患危険度判定用  
マイクロアレイ、動脈硬化性疾患危険度判定装置および動脈硬化性疾患危険度判定プログラム

(57) Abstract: A method of judging the risk of arterial sclerosis in which the tendency to crisis of arterial sclerosis, tendency to  
progress thereof, etc. can be accurately judged as the risk of arterial sclerosis to thereby enable use of the method in the prevention  
and treatment of arterial sclerosis; a kit for analysis of genetic polymorphism which is used in the judging of the risk, etc.; a device  
for judging the risk of arterial sclerosis; etc. The method of judging the risk of arterial sclerosis is characterized in that it comprises  
a risk determining step wherein the risk of arterial sclerosis attributed to genetic polymorphism is determined from the genetic type  
of genetic polymorphism of examinee on the basis of the risk of arterial sclerosis peculiar to a combination of a plurality of genetic  
polymorphisms, and that at least one of the combination of a plurality of genetic polymorphisms exhibits a significant positive asso-  
ciation between the combination of a plurality of genetic polymorphisms and a level of thickening of carotid intima/media composite.

(57) 要約: 動脈硬化性疾患の発症しやすさや、進行しやすさ等を動脈硬化性疾患危険度として正確に判定でき、動  
脈硬化の予防および治療に利用できる動脈硬化性疾患危険度判定方法、該危険度の判定等に用いられる、遺伝子多  
型分析用キットおよび動脈硬化性疾患危険度判定装置等を提供することを課題とする。複数の遺伝子多型の、組  
合せに固有の動脈硬化危険度に基づき、被験対象の該遺伝子多型の遺伝子型から、遺伝子多型による動脈硬化危険  
度を決定する危険度決定工程を含み、前記複数の遺伝子多型の組合せの少なくとも一つが、該複数の遺伝子多型  
の組合せと、頸動脈内中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有することを特徴とする動脈硬化性疾患危  
険度判定方法。

WO 03/087360 A1

動脈硬化性疾患危険度判定方法、動脈硬化性疾患危険度測定方法、動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイ、動脈硬化性疾患危険度判定装置および動脈硬化性疾患危険度判定プログラム

## 技術分野

本発明は、動脈硬化性疾患危険度の判定に関し、より詳しくは動脈硬化の予防、治療および診断に利用できる動脈硬化性疾患危険度判定方法、動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法、動脈硬化性疾患危険度測定方法、遺伝子多型検出方法、遺伝子マーカー、遺伝子多型分析用キット、動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイ、動脈硬化性疾患危険度判定装置および動脈硬化性疾患危険度判定プログラムに関する。

## 背景技術

動脈硬化性疾患（虚血性心疾患）の発症には、高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満、喫煙などの環境要件が、危険因子として関係することが知られているが、家族歴もまた、危険因子の一つであり、近年の分子生物学的手法の発展により、動脈硬化に関係する遺伝子上に存在する種々の遺伝子多型が明らかになっており、疾病への関与が研究されている。

このような疾病に関与する遺伝子多型を危険因子として、被験対象の遺伝子多型の遺伝子型等の情報から、疾病になりやすさや、進行しやすさ等のいわゆる動脈硬化性疾患危険度が判定できれば、危険度の高い被験対象は早期に日常から疾病の予防に心がけることができるし、発症後の進行度なども予測することができ、よりきめ細かい診断および治療に役立てることができる。

しかし、動脈硬化疾患においてこれまで報告されてきたSNPを含む遺伝子多型の臨床関連研究においては、単一の遺伝子多型を調べて、該遺伝子多型について一の遺伝子型の集団と、他の遺伝子型の集団とにおいてそれぞれ、心筋梗塞患者と健常者との割合を調べることにより、心筋梗塞になりやすさのオッズ比を算出している。このような調査方法では、ほとんどの多型は有意差がなく、遺伝子

多型から疾病のなりやすさや、進行しやすさ等の危険度を予測することはできなかった。

(非特許文献) Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. N. Engl. J. Med. 2002; 347(24): 1916-23

#### 発明の開示

本発明は、従来における動脈硬化性疾患の危険度の判定に関する問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。すなわち、動脈硬化性疾患の発症しやすさや、進行しやすさ等を動脈硬化性疾患危険度として正確に判定でき、動脈硬化の予防および治療に利用できる動脈硬化性疾患危険度判定方法、該危険度の判定等に用いられる動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法、動脈硬化性疾患危険度測定方法、遺伝子多型検出方法、遺伝子マーカー、遺伝子多型分析用キット、動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイ、動脈硬化性疾患危険度判定装置および動脈硬化性疾患危険度判定プログラムを提供することを目的とする。

本発明者らは、多数の遺伝子多型について、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との関係を定量的に解析し、さらに、複数の該遺伝子多型が組み合わさった場合に、前記頸動脈内膜中膜複合体肥厚度に相加的または相乗的に有意な影響を与えとの知見を得た。

本発明は、本発明者らの前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段は以下のとおりである。

< 1 > 複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度に基づき、被験対象の該遺伝子多型の遺伝子型から、遺伝子多型による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程を含み、

前記複数の遺伝子多型の組合せの少なくとも一つが、該複数の遺伝子多型の組合せと、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有することを特徴とする動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 2 > 複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度が、該組合せと頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有するか否かで設定される前記< 1 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 3 > 複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度が、該組合せと頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する頻度のオッズ比で設定される前記< 1 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 4 > 複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度が、頸動脈内膜中膜肥厚度増加量で設定される前記< 1 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 5 > 複数の遺伝子多型の、組合せが、下記表 1－1 から表 1－4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを含む前記< 1 >から< 4 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

[表1-1]

番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類
3	1_2	46	1_2				
1	3	21	1	28	1_2		
1	3	28	1_2	29	1		
1	3	28	1_2	40	1_2		
1	3	28	1_2	34	2_3		
3	1_2	4	1	7	2_3		
3	1_2	7	2_3	17	1_2		
3	1_2	7	2_3	31	1_2		
3	1_2	7	2_3	34	1_2		
3	1_2	8	3	46	1_2		
3	1_2	9	1_2	46	1_2		
3	1_2	12	2_3	31	1_2		
3	1_2	12	2_3	46	1_2		
3	1_2	13	2_3	46	1_2		
3	1_2	14	2_3	46	1_2		
3	1_2	15	1_2	25	1_2		
3	1_2	15	1_2	46	1_2		
3	1_2	22	1_2	31	1_2		
3	1_2	24	1_2	46	1_2		
3	1_2	25	1_2	31	1_2		
3	1_2	26	3	46	1_2		
3	1_2	28	2_3	31	1_2		
3	1_2	28	2_3	46	1_2		
3	1_2	29	1_2	46	1_2		
3	1_2	30	1_2	46	1_2		
3	1_2	31	1_2	41	1		
3	1_2	41	1	42	1_2		
3	1_2	41	1	46	1_2		
3	1_2	43	2_3	46	1_2		
3	1_2	44	1_2	46	1_2		
3	1_2	42	1_2	47	2_3		
3	1_2	46	1_2	49	1_2		
4	1	7	1_2	28	1_2		
4	1	28	1_2	40	1_2		
4	2_3	25	1	40	1_2		
6	1	7	1	20	1		
7	1	37	3	45	1		
11	3	20	3	32	1_2		
11	1	35	1	38	3		
11	1	38	3	40	1_2		
17	1	36	1_2	37	3		
17	1	37	3	48	1		
17	2_3	28	1_2	40	1_2		
20	3	22	1	24	2_3		

[表1-2]

番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類
20	3	24	2_3	33	1_2		
20	3	24	2_3	38	1_2		
20	3	24	2_3	48	1		
17	1	20	3	32	1_2		
20	3	32	1_2	40	1_2		
20	3	32	1_2	38	3		
21	1	28	1_2	40	1_2		
11	1_2	25	1	38	3		
17	1	25	1	38	3		
23	1_2	25	1	38	3		
25	1	36	1	38	3		
25	1	38	3	40	1_2		
28	1_2	32	3	40	1_2		
7	1_2	28	1_2	33	1_2		
28	1_2	38	2_3	40	1_2		
31	3	32	3	47	1		
4	1_2	31	3	45	2_3		
15	1	31	3	45	2_3		
31	3	45	2_3	46	1_2		
34	3	36	1_2	39	1_2		
34	3	37	1	47	1		
17	1_2	34	3	39	1_2		
34	3	39	1_2	41	1		
34	3	39	1_2	45	1		
16	1	34	1	40	1		
18	1	34	1	40	1		
24	1	34	1	40	1		
34	1	40	1	45	1		
12	1_2	39	1_2	43	3		
1	2_3	11	3	31	2_3	39	1_2
2	1	7	3	20	3	38	3
2	1	25	1_2	38	3	39	1_2
2	1	33	2_3	38	3	39	1_2
2	1	11	3	31	2_3	39	1_2
2	1	35	1	38	3	39	1_2
4	2_3	20	3	33	1_2	40	1_2
4	2_3	23	3	33	1_2	40	1_2
4	2_3	33	1_2	40	1_2	47	1_2
4	2_3	11	3	20	3	40	1_2
4	2_3	20	3	31	2_3	40	1_2
4	2_3	29	1	38	3	40	1_2
5	1	11	3	39	1_2	43	3
5	1	12	1_2	20	3	23	3
5	1	15	1	20	3	32	1_2

[表1-3]

番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類
5	1	20	3	23	3	31	3
5	1	20	3	37	2_3	39	1_2
5	1	12	1_2	25	1	44	1
5	1	25	1	39	1_2	45	1
6	1_2	11	3	37	2_3	39	1_2
6	1_2	11	3	39	1_2	43	3
6	1	15	1	17	3	25	1
6	1	17	3	33	1_2	40	1_2
6	1	11	3	20	1	42	1_2
6	1	20	1	23	3	40	1_2
6	2_3	9	1	22	2_3	25	1
6	2_3	22	2_3	25	1	42	1_2
6	2_3	20	3	25	1	46	1_2
7	3	9	1_2	20	3	38	3
7	3	13	3	20	3	38	3
7	3	14	3	20	3	38	3
7	3	20	3	22	1_2	38	3
7	3	20	3	23	3	38	3
7	3	20	3	27	3	38	3
7	3	20	3	29	1	38	3
7	3	20	3	30	1	38	3
7	3	20	3	33	1_2	40	1_2
7	3	20	3	35	1	38	3
7	3	20	3	38	3	49	1_2
7	2_3	17	2_3	33	1	40	1_2
9	1	12	1_2	34	3	36	1_2
9	1	20	3	31	3	36	1_2
9	1	31	3	33	1_2	40	1_2
9	1	12	1_2	24	1	34	3
9	1_2	25	1	39	1_2	45	1
9	1_2	25	1	39	1_2	46	1_2
11	3	16	1	31	2_3	39	1_2
11	3	17	1_2	31	2_3	39	1_2
11	3	18	1	31	2_3	39	1_2
11	3	22	1_2	31	2_3	39	1_2
11	3	23	2_3	31	2_3	39	1_2
11	3	31	2_3	36	1_2	39	1_2
11	3	39	1_2	42	1_2	43	3
11	3	39	1_2	43	3	47	1_2
12	1_2	20	3	23	3	36	1_2
12	1_2	23	3	32	1_2	41	1
12	1_2	40	1_2	42	1	47	1_2
12	1_2	25	1	34	1_2	44	1
13	3	25	1_2	38	3	39	1_2

[表1-4]

番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類
13	3	36	1_2	38	3	39	1_2
13	3	38	3	39	1_2	43	3
14	3	15	1	20	3	32	1_2
14	3	20	3	23	3	31	3
15	1	25	1	31	3	32	3
15	1	17	2_3	31	3	40	1_2
15	1	31	3	33	1_2	40	1_2
15	1	20	3	23	3	32	1_2
15	1	20	3	32	1_2	36	1_2
17	1	20	3	25	1	31	2_3
20	3	23	3	31	3	32	3
20	3	23	3	31	3	38	2_3
20	2_3	28	1_2	40	1_2	42	2_3
20	3	28	1_2	29	1	46	2_3
20	3	29	1	37	2_3	39	1_2
20	3	29	1	39	1_2	42	1_2
20	3	29	1	39	1_2	43	3
20	3	22	1	23	3	32	1_2
20	3	36	1_2	37	2_3	39	1_2
20	3	36	1_2	39	1_2	45	1
20	3	38	3	39	1_2	43	3
20	3	23	3	32	1_2	46	1_2
20	3	37	2_3	39	1_2	46	1_2
20	3	39	1_2	42	1_2	46	1_2
20	3	39	1_2	45	1	46	1_2
20	3	39	1_2	46	1_2	47	1_2
20	3	37	2_3	39	1_2	48	1
23	3	37	3	38	3	48	1
23	3	31	2_3	39	1_2	47	1_2
23	3	37	2_3	39	1_2	47	1_2
25	1	34	1_2	38	3	44	1
25	1	33	2_3	39	1_2	45	1
25	1	39	1_2	45	1	47	1_2
25	1	33	2_3	39	1_2	46	1_2
28	1_2	29	1	33	1_2	40	1_2
28	1_2	29	1	40	1_2	42	2_3
28	1_2	34	2_3	40	1_2	42	2_3
28	1_2	33	1_2	40	1_2	48	1
28	1_2	40	1_2	42	2_3	48	1
31	3	32	3	33	1_2	37	2_3
35	1	38	3	39	1_2	43	3
35	1	37	3	44	2_3	48	1
35	1	39	1_2	43	3	44	2_3
36	1	37	3	40	1_2	42	2_3



表 1 - 1 から表 1 - 4 中、「番号」は下記表 2 - 1 から表 2 - 2 中の同一番号の遺伝子多型を表し、「分類」の番号は遺伝子多型の遺伝子型のうち、組合せの対象となった遺伝子型を表し、1 は表 2 - 1 から表 2 - 2 中の遺伝子多型名において左側に表される多型のホモを、2 はヘテロを、3 は、右側に表される多型のホモを表し、1 2 は前記 1 と 2 とをまとめた遺伝子型、2 3 は前記 2 と 3 とをまとめた遺伝子型を表す。

[表2-1]

多型 番号	遺伝子多型名	ref. SNP ID	文献 番号	配列 番号	遺伝子の Accession番号
1	Enos(T-786C)		1		GDB:209976
2	Enos (Glu298Asp)	rs1799983			
3	IRS-1(GLY971ARG)	rs1801278			
4	glycogen_synthase(M416V)		2		GDB:134184
5	p22phox(C242T)		3		GDB:125238
6	interleukin6(C-634G)	rs3087226			
7	TGF beta(T29C/Leu10Pro)		4		GDB:581114
8	TNF- $\alpha$ (g-308a)		25	1	GDB:1336833
9	mmp-9(C-1562T)		5		GDB:125224
10	MMP-12(A-82G)		6		GDB:266582
11	MCP-1(A-2518G)		7		GDB:125279
12	MPO(G-463A)		8		GDB:120192
13	fractalkine_receptor(V249I)	rs3732379			
14	CRP(G1059C)		26	4	GDB:119071
15	connexin37(C1019T)		21		GDB:127818
16	E-selectin(Ser128Arg)		9		GDB:120612
17	ICAM1(E469K)	rs5498			
18	E-selectin(G98T)		22		GDB:120612
19	Dopamine-D2receptor (Ser311Hys)	rs1801028			
20	ACE(I/D)		23		GDB:119840
21	AT2-receptor(a1166c)	rs1064536			
22	angiotensinogen(t704c)		10		GDB:118750
23	beta3 adrenoceptor(Trp64Arg)		27	3	GDB:203869
24	beta2 Adrenoreceptor(C79T)	rs1042714			
25	beta-adrenergic receptor(A46G)	rs4997			
26	HANP(T2238C)	rs5065			
27	GPIIbIIIa(C1565T)		24		
28	GPIa(A1648G)		11		
29	HPA-2(Thr145Met)		28	5	GDB:11510064

[表2-2]

多型 番号	遺伝子多型名	ref. SNP ID	文献 番号	配列 番号	遺伝子の Accession番号
30	GlycoproteinVI(Ser219Pro)	rs1613662			GDB:11500433
31	glycoproteinIa(C807T)		12		GDB:118806
32	Thrombomodulin(G-33A)		13		GDB:119613
33	FactorXII (C46T)	rs1801020			
34	alfa-Fib(Thr312Ala)		29	6	GDB:119129
35	beta Fib(C148T)		14		GDB:119130
36	PAI-1(4G/5G)		15		GDB:120297
37	MTHFR(C677T)	rs1801133			
38	ABCA1(G1051A)		16		GDB:305294
39	HUMPONA(MET55LEU)	rs854560			
40	PON1(Gly192Arg)	rs662			
41	PPAR_gamma(PRO12ALA)	rs1801282			
42	hepatic_lipase(C-480T)		17		GDB:119366
43	Apo E(Cys112Arg)		30	2	GDB:119691
44	microsomal triglyceride transfer protein (G-493T)		31	7	GDB:228961
45	lipoprotein lipase(Ser447STOP)	rs328			
46	Alfa_estrogen_receptor(PvuII in intron1)		18		GDB:119120
47	serotonin_2A_receptor(T102C)		19		
48	Glutamate-cystein ligase(C-588T)		32	8	GDB:132915
49	matrilyn promoter(A-181G)		20		

< 6 > 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも少なくとも 0.2 mm 厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも 150 例の動脈硬化疾患例集団において、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せを有する例が 30 % 以上となり、

少なくとも 150 例の非動脈硬化疾患例集団において、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せを有する例が 15 % 以下となるように、

複数の遺伝子多型の組合せが選択される前記< 1 >から< 5 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 7 > 動脈硬化疾患例集団および非動脈硬化疾患例集団が、いずれも糖尿病患者であって、心筋梗塞病歴がない集団である前記< 6 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 8 > 複数の遺伝子多型の組合せが、2 から 5 個の少なくともいずれかの遺伝子多型の組合せである前記< 1 >から< 7 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 9 > 複数の遺伝子多型の組合せが、少なくとも 3 個の遺伝子多型からなる前記< 1 >から< 8 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 10 > 複数の遺伝子多型の組合せが、下記の a) から 1) のいずれかの群に属する少なくとも二つの遺伝子多型を含む前記< 1 >から< 9 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) TNF- $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群

- f) IRS-1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- g) FABP2 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
- i) NADP・NADPH酸化酵素 p22phox に関連する遺伝子多型群
- j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素に関連する遺伝子多型群
- k) 熱ショックタンパク質 70-1 に関連する遺伝子多型群
- l) TGF- $\beta$ 1 遺伝子に関連する遺伝子多型群

<11> 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型と

、  
レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) に関連する遺伝子多型群、および、脂質に関連する遺伝子多型群の少なくともいずれかに属する遺伝子多型とを少なくとも含む前記<10>に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

<12> 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型が、PAI-1 遺伝子に関連する遺伝子多型である前記<11>に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

<13> レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型が、ACE 遺伝子に関連する遺伝子多型である前記<11>から<12>のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

<14> 脂質に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型が、HUMPOMA 遺伝子に関連する遺伝子多型である前記<12>から<13>のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

<15> 環境因子に固有の動脈硬化危険度に基づき、被験対象の該環境因子の情報から該環境因子による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程をさらに含む、前記<1>から<14>のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

<16> 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度に固有の動脈硬化危険度に基づき、被験対象の該頸動脈内膜中膜複合体肥厚度から頸動脈内膜中膜複合体肥厚度による

動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程をさらに含む前記< 1 >から< 1 5 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 1 7 > 動脈硬化性疾患危険度判定方法が、複数の危険度決定工程を有し、該危険度決定工程ごとに求められる動脈硬化危険度を総合して動脈硬化性疾患危険度を算出する動脈硬化性疾患危険度算出工程を含む前記< 1 >から< 1 6 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 1 8 > 被験対象の複数の遺伝子多型の遺伝子型を検出する検出工程を、顕在化工程前にさらに含む前記< 1 >から< 1 7 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 1 9 > 被験対象の複数の遺伝子多型の遺伝子型を検出する検出工程と、複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度に基づき、前記検出工程で検出された被験対象の遺伝子多型の遺伝子型から、遺伝子多型による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程とを含み、前記複数の遺伝子多型の少なくとも一の組合せが、該複数の遺伝子多型の組合せと、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有することを特徴とする動脈硬化性疾患危険度測定方法である。

< 2 0 > 被験対象の遺伝子多型のうち、動脈硬化関連遺伝子多型セットにかかる複数の遺伝子多型の遺伝子型を選択的に明らかにすることにより、該被験対象の遺伝子多型における動脈硬化関連遺伝子多型セットを顕在化させる顕在化工程を含み、

該動脈硬化関連遺伝子多型セットが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せであり、動脈硬化性疾患関連因子であることを特徴とする動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法である。

< 2 1 > 顕在化工程が、選択的に明らかにされた複数の遺伝子多型の遺伝子型が、動脈硬化関連遺伝子多型セットに該当するか否かにより表される前記< 2 0 >に記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法である。

< 2 2 > 顕在化工程が、選択的に明らかにされた複数の遺伝子多型の遺伝子型が、動脈硬化関連遺伝子多型セットに該当する場合に、動脈硬化関連遺伝子多

型セットに固有の、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する頻度のオッズ比により表される前記< 20 >に記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法である。

< 23 > 顕在化工程が、選択的に明らかにされた複数の遺伝子多型の遺伝子型が、動脈硬化関連遺伝子多型セットに該当する場合に、動脈硬化関連遺伝子多型セットに固有の頸動脈内膜中膜肥厚度増加量により表される前記< 20 >に記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法である。

< 24 > 動脈硬化関連遺伝子多型セットが、上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを含む前記< 20 >から< 23 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法である。

< 25 > 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも少なくとも0.2mm厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも150例の動脈硬化疾患例集団において、少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを有する例が30%以上となり、

少なくとも150例の非動脈硬化疾患例集団において、少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを有する例が15%以下となるように、

動脈硬化関連遺伝子多型セットが選択される前記< 20 >から< 24 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法である。

< 26 > 動脈硬化疾患例集団および非動脈硬化疾患例集団が、いずれも糖尿病患者であって、心筋梗塞病歴がない集団である前記< 25 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法である。

< 27 > 動脈硬化関連遺伝子多型セットが、2から5個の少なくともいずれかの遺伝子多型からなる前記< 20 >から< 26 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法である。

< 28 > 動脈硬化関連遺伝子多型セットが、少なくとも3個の遺伝子多型からなる前記< 20 >から< 27 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕

在化方法である。

< 2 9 > 動脈硬化関連遺伝子多型セットが、下記のa)から l) のいずれかの群に属する少なくとも二つの遺伝子多型を含む前記< 2 0 >から< 2 8 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法である。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) T N F -  $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群
- f) I R S - 1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- g) F A B P 2 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
- i) N A D P ・ N A D P H 酸化酵素 p 2 2 p h o x に関連する遺伝子多型群
- j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素に関連する遺伝子多型群
- k) 熱ショックタンパク質 7 0 - 1 に関連する遺伝子多型群
- l) T G F -  $\beta$  1 遺伝子に関連する遺伝子多型群

< 3 0 > 被験対象の複数の遺伝子多型の遺伝子型を検出する検出工程を顕在化工程前にさらに含む前記< 2 0 >から< 2 9 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法である。

< 3 1 > 上記表 1 - 1 から表 1 - 4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子多型について、被験対象の遺伝子型を検出する工程を含み、

検出結果が動脈硬化性疾患危険度判定のために用いられることを特徴とする遺伝子多型検出方法である。

< 3 2 > 上記表 1 - 1 から表 1 - 4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子多型を含む遺伝子マーカーである。

< 3 3 > 上記表 1 - 1 から表 1 - 4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セッ



トのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子の特異的に増幅し得るプライマー対あるいは遺伝子に特異的にハイブリダイズし得る核酸プローブを含み、

少なくとも一の表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットを検出することを特徴とする遺伝子多型分析用キットである。

< 3 4 > 動脈硬化関連遺伝子多型セットが少なくとも 3 個の遺伝子多型を含むものである前記< 3 3 >に記載の遺伝子多型分析用キットである。

< 3 5 > 表 2-1 から表 2-2 中に記載の遺伝子多型から選択された少なくとも 2 個の遺伝子多型の遺伝子多型検出用プライマーおよびプローブの少なくともいずれかを有し、

頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも 0.2 mm 以上厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも 150 例の動脈硬化疾患例集団において、該選択された遺伝子多型で構成され得る上記表 2-1 から表 2-2 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットにおける頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子型の組合せを少なくとも一つ有する例が 30% 以上となり、

少なくとも 150 例の非動脈硬化疾患例集団において、15% 以下となる前記< 3 3 >から< 3 4 >のいずれかに記載の遺伝子多型分析用キットである。

< 3 6 > 表 2-1 から表 2-2 中に記載の遺伝子多型から選択された少なくとも 2 個の遺伝子多型についての遺伝子多型検出用プライマーまたはプローブを有し、

頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも 0.2 mm 以上厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも 150 例の動脈硬化疾患例集団において、該選択された遺伝子多型で構成され得る上記表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットにおける頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝

子型の組合せを有する例が50%以上となり、

少なくとも150例の非動脈硬化疾患例集団において、15%以下となる前記<33>から<35>のいずれかに記載の遺伝子多型分析用キットである。

<37> 複数の遺伝子多型検出用プライマーまたはプローブが下記のa)からl)の互いに異なるいずれかの群に属する前記<33>から<36>のいずれかに記載の遺伝子多型分析用キットである。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) TNF- $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群
- f) IRS-1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- g) FABP2 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
- i) NADP・NADPH酸化酵素 p22phox に関連する遺伝子多型群
- j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素に関連する遺伝子多型群
- k) 熱ショックタンパク質70-1に関連する遺伝子多型群
- l) TGF- $\beta$  1 遺伝子に関連する遺伝子多型群

<38> 上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子多型の、遺伝子多型検出用プローブを有することを特徴とする動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイである。

<39> コンピューターを利用した動脈硬化性疾患危険度判定装置であつて、複数の遺伝子多型の、組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルと、

入力された、被験対象の複数の遺伝子多型の組合せと、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける複数の遺伝子多型の組合せとを照合し、一致する遺伝子多型の組合せがある場合に、該遺伝子多型の組合せに対応する該動脈硬化危険度を

検出する検出手段とを有することを特徴とする動脈硬化性疾患危険度判定装置である。

< 4 0 > 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として 1 単位を対応させたものである前記< 3 9 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置である。

< 4 1 > 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比を対応させたものである前記< 3 9 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置である。

< 4 2 > 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加を対応させたものである前記< 3 9 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置である。

< 4 3 > 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子多型の組合せであることが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比が一定以上であること、および、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の平均値に有意差があることの少なくともいずれかにより定義される前記< 3 9 >から< 4 2 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置である。

< 4 4 > 環境因子の有無または数値と、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルと、

入力された、被験対象の環境因子の有無または数値と、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける環境因子の有無または数値とを照合し、該環境因子の有無または数値に対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段とをさらに有する前記< 3 9 >から< 4 3 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置であ

る。

< 4 5 > 動脈硬化性疾患危険度判定装置が複数の検出手段を有し、前記複数の検出手段から検出された複数の頸動脈危険度の加算値に基づき動脈硬化性疾患危険度を判定する判定手段をさらに有する前記< 3 9 >から< 4 4 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置である。

< 4 6 > 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度と、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルと、

入力された、被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度と、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける頸動脈内膜中膜複合体肥厚度とを照合し、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度に対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段とをさらに有する前記< 3 9 >から< 4 5 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置である。

< 4 7 > 前記検出手段から検出された頸動脈危険度および複数の前記抽出手段から抽出された頸動脈危険度の加算値のいずれかと、入力された、被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との加算値に基づき動脈硬化性疾患危険度を判定する判定手段をさらに有する前記< 3 9 >から< 4 6 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置である。

< 4 8 > 被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度を測定して、前記頸動脈内膜中膜複合体肥厚度を前記コンピューターに供給する血管膜圧測定手段を含む前記< 3 9 >から< 4 7 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置である。

< 4 9 > 複数の遺伝子多型の、組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルをコンピューターに記憶させ、

該コンピューターを、入力された、被験対象の複数の遺伝子多型の組合せと、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける複数の遺伝子多型の組合せとを照合し、一致する遺伝子多型の組合せがある場合に、該遺伝子多型の組合せに対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段として機能させることを特徴とする動脈硬化性疾患危険度判定プログラムである。

< 5 0 > 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として1単位を対応させたものである前記< 4 9 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定プログラムである。

< 5 1 > 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比を対応させたものである前記< 4 9 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定プログラムである。

< 5 2 > 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加を対応させたものである前記< 4 9 >に記載の動脈硬化性疾患危険度判定プログラムである。

< 5 3 > 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子型の組合せであることが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比が一定以上であること、および、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の平均値に有意差があることの少なくともいずれかにより定義される前記< 4 9 >から< 5 2 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定プログラムである。

< 5 4 > 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも少なくとも0.2mm厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも150例の動脈硬化疾患例集団において、動脈硬化危険度を少なくとも1単位有する例が30%以上となり、

少なくとも150例の非動脈硬化疾患例集団において、動脈硬化危険度を少なくとも1単位有する例が15%以下となる、

前記< 4 9 >から< 5 3 >のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定プログ

ラムである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、表2-1から表2-2中に特定される遺伝子多型の配列を表した図である。

図2は、表2-1から表2-2中に特定される遺伝子多型の配列を表した図である。

図3は、実施例4における、組合せを構成する遺伝子多型の数による適合症例比率を表した図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### (動脈硬化性疾患危険度判定方法)

本発明の動脈硬化性疾患危険度判定方法は、複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度に基づき、被験対象の該遺伝子多型の遺伝子型から、遺伝子多型による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程を含み、前記複数の遺伝子多型の組合せの少なくとも一つが、該複数の遺伝子多型の組合せと、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有することを特徴とし、この工程を含む限り、他のいかなる工程を含むものであってもよい。

前記動脈硬化性疾患とは、虚血性疾患をいい、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、末梢動脈閉塞症が含まれる。また、前記動脈硬化性疾患危険度は、前記動脈硬化性疾患の発症しやすさや、進行しやすさを表す指標である。

前記遺伝子多型とは、一つの遺伝子座に複数の対立遺伝子（アレル）が存在する多様性を意味する。しかし、ここでいう遺伝子はRNAとして転写される領域に限定されるものではなく、プロモーター、エンハンサー等の制御領域などを含むヒトゲノム上で特定しうるすべてのDNAを含むものである。

ヒトゲノムDNAの99.9%は各個人間で共通しており、残る0.1%がこのような多様性の原因となり、特定の疾患に対する感受性、薬物や環境因子に対する反応性の個人差として関与し得る。遺伝子多型があっても表現型に差が出ると

は限らない。SNP（一塩基多型）も該遺伝子多型の一種であるが、本発明の遺伝子多型はこれに限られない。

本発明に用いられる遺伝子多型としては、動脈硬化性疾患に関与することが推定される公知の遺伝子多型のなかから、下記の複数の遺伝子多型の要件を満たすように適宜選択することができる。

本発明に用いられる複数の遺伝子多型の、組合せとしては、上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを含むものであることが好ましい。表1-1から表1-4中は、実施例4で詳述するが、糖尿病患者で、心筋梗塞病歴のない母集団において、早期動脈硬化を有する約437例について、早期動脈硬化を有さない約195例を対照にケースコントロールスタディーを行い、有意水準をオッズ比10以上かつカイ二乗値6.635（ $P < 0.01$ ）以上として、頸動脈内膜中膜肥厚度との間に正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せを抽出した結果である。一行が、それぞれ動脈硬化関連遺伝子多型セットである。本発明に用いられる複数の遺伝子多型は、上記表1-1から表1-4中の動脈硬化関連遺伝子多型セットを含んでさらに他の遺伝子多型と組み合わせたものであってもよい。

また、本発明に用いられる複数の遺伝子多型としては、表3に挙げられる遺伝子多型も用いることができる。なお、表3の遺伝子多型に関する文献を表4に記載する。表3および表4において同一番号は同一の遺伝子多型に付与されている。

[表3]

番号	関連因子	symbol	cyto	部位	危険因子となる対立遺伝子型	アミノ酸変異
一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型						
1	eNOS	NOS3	7q36	第7エクソン	D型 (Glu298 → Asp)	GLu298 → Asp
2	eNOS	NOS3	7q36	5'非翻訳領域	C型 (T-786 → C)	
3	eNOS	NOS3	7q36	第4イントロン	4repeat型 (4repeats → 5repeats)	
レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型						
4	ACE	ACE	17q23	第16イントロン	D型 [I, D (I: 挿入型, D: 欠失型)]	
5	アンジオテンシノーゲン	AGT	1q42-q43	第2エクソン	T型 (Met 235 → Thr)	Met235Thr
6	AT1 R	AGTR1	3q21-q25	3'非翻訳領域	C型 (A-1.166 → C)	
血小板機能・凝固系に関する遺伝子多型						
7	GP Ib, IX	GP1BA	17pter-p 12	Ib a 鎖	M型 (Thr 145 → Met)	Thr145Met
8	GP II b, III a	ITGB3	17q21.32	III a 鎖	A2型 (P1: A1 → A2)	
9	PAFアセチルヒドロラーゼ	LOC130273	2q35	第9エクソン	T型 (G 994 → T)	
10	凝固第Ⅶ因子	F7	13q34	第4イントロン	H7H5 (H7, H6, H5)	
11	凝固第Ⅶ因子	F7	13q34	第8エクソン	G353 → A	R型 (Arg → Gln)
12	凝固第Ⅷ因子Aサブユニット	F8	Xq28	第2エクソン	G型 (G, T)	
13	凝固第ⅩⅡ因子	F12	5q33-qter	5'非翻訳領域	C型 (C46 → T)	
14	フィブリノーゲン	FGB	4q28	β 鎖	A型 (G-455 → A)	
15	PAI-1	SERPINE1	7q21.3-q22	プロモーター	4G型 (4G, 5G)	
脂質に関連する遺伝子多型						
16	アポタンパク質E	APOE	19q13.2	第4エクソン	E型 (E2, E3, E4)	
17	アポタンパク質A	APOA1	11q23-q24	KringleIV	T型 (Met 66 → Thr)	Met66Thr
18		APOA2	1q21-q23			
19		APOA4	11q23			
20		APOAV	11q23			
21	アポタンパク質B	APOB	2p24-p23		X+型 (X+, X-)	
22	LPL	LPL	8p22	第9エクソン	X型 (Ser 477 → stop)	Ser477Ter
23	CETP	CEPT	16q21	第1イントロン	B1型 (B1, B2)	
24	HUMPONA	PON1	7q21.3	第192コドン	Arg型 (Glu192 → Arg)	Glu192 → Arg
25						Met55 → Leu
その他の因子						
26	熱ショックタンパク質70-1	HSPA1A	6q21.3	プロモーター	A型 (C-110 → A)	
27		HSPA1B	6q21.3			
28	TNF-α	TNF	6q21.3	5'非翻訳領域	A型 (G-308 → A)	
29	p22phox	LOC113690	16q24.2	第4エクソン	C242 → T	His72 → Tyr
30	MTHFR	MTHFR	1q36.3		Val型 (C677→TによりAla → Valとなる多型)	Ala → Val
31	TGF-β 1	TGFB1	19q13.1	第1エクソン	T29 → C	Leu10Pro
32				第1エクソン	G74 → C	Arg25Pro
33	IRS-1	IRS1	2q36		codon 972	Gly972Arg
34	glycogen synthase	GYS1		第10エクソン		Met416Val
35	fatty acid binding protein	FABP2	4q28,q31		codon 54	Ala54Thr



[表4]

番号	文献1:多型と活性	文献2:動脈硬化症との関連性
1	J Am Coll Cardiol 1998; 31: 1506-10	J Am Coll Cardiol 1998; 31: 1506-10
2	Circulation 1999; 99: 2864-70	Circulation 1999; 99: 2864-70
3		
4		
5		
6	Hypertension 1994; 24: 63-9	Lancet 1994; 344: 910-3 With ACE-DD
7	Blood 1992; 79: 3086-90	
8		N Engl J Med 1996; 334: 1090-4
9		
10		
11	Arterioscler Theromb 1991; 11:540-6	N Engl J Med 1998; 338: 79-85
12		
13		
14		
15	Arterioscler Thromb 1991; 11:183-90	Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 1851-5
16	Atherosclerosis 1988; 8: 1-21	Lancet 1992; 340: 879-80
17		
18		
19		
20		
21		Lancet 1988; 2: 1442-5
22		
23	Atherosclerosis 1994; 110: 35-44	N Engl J Med 1998; 338: 86-93
24		
25	Nat Genetics 1993; 3: 73-6	Metabolism 2001; 50: 1095-101
26		
27		
28		Atherosclerosis 2001; 154: 691-7 否定的
29	Am J Hum Genet 1992; 51: 1127-35	Circulation 1998; 97: 135-7
30	Nat Genetics 1995; 10: 111-3	Circulation 1997; 95: 21-3
31	Nucleic Acid Res 1987; 15: 3188-9	Circulation 2000; 101: 2783-7
32	Nucleic Acid Res 1987; 15: 3188-9	Hypertension 1996; 28: 881-7
33	Lancet 1993; 342: 828-32	Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2975-80
34	Diabetologia 1997; 40: 947-52	Diabetologia 1997; 40: 947-52
35	J Clin Invest 1995; 95: 1281-7	J Clin Invest 1995; 95: 1281-7

前記複数の遺伝子多型とは、異なる遺伝子座を有する2種以上の遺伝子多型をいい、2種の遺伝子多型であれば、例えば、表3中に記載されている、SERPINE1とACEとをいい、3種の遺伝子多型であれば、例えばSERPINE1と、APOA1と、APOA2とをいう。

前記遺伝子多型の組合せとは、前記複数の遺伝子多型の遺伝子型が組み合わさることをいう。例えば、表3中に記載されるPAI-1を関連因子とするプロモーター部位の多型であるSERPINE1多型には、Gのリピート数が異なる4G型と5G型の対立遺伝子が存在し、そのうち4G型が危険因子となる。このSERPINE1多型について被験対象の遺伝子型は、4G/4G、4G/5Gおよび5G/5Gのいずれかになる。同様に、表3中に記載されるACEを関連因子とする第16イントロンの多型であるACE多型には、挿入型（I型）と欠失型（D型）の対立遺伝子が存在し、このうちD型が危険因子となる。このACE多型について被験対象の遺伝子型は、D/D、D/IおよびI/Iのいずれかになる。そこで、このSERPINE1多型と、ACE多型を、複数の遺伝子多型として選択した場合、この両多型に関する遺伝子多型の組合せは、4G/4GとD/Dとを有する場合、4G/4GとD/Iとを有する場合等、全部で9通りできる。この9通りについて、すべて個々に危険度を設定することもできるが、例えば、SERPINE1多型について被験対象の遺伝子型を、危険対立遺伝子をホモで有する4G/4Gと、それ以外の、4Gと5Gとをヘテロで有するか5Gをホモで有する5G/?とに分類し、ACE多型についても同様にD/Dと、I/?とに分類し、両多型の遺伝子型の組合せを4G/4GとD/Dとを有する場合、4G/4GとI/?とを有する場合、5G/?とD/Dとを有する場合、5G/?とI/?とを有する場合との4通りに統合して、遺伝子多型の組合せとすることもできる。さらに、危険因子をホモに有する遺伝子型同士の組合せと（4G/4GとD/Dとの組合せ）、それ以外の組合せとの2通りに統合して、危険度を設定することもできる。また、実施例4で詳述するように、一定の規則で組合せを統合して、危険度を設定することもでき、このような統合に特に制限はない。

前記複数の遺伝子多型の組合せの少なくとも一つは、該複数の遺伝子多型の組合せと、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型であることを要する。

例えば、PAI-1を関連因子とするSERPINE1多型、MTHFRを関連因子とするMTHFR多型、およびACEを関連因子とするACE多型の4G/4GとVal/ValとD/Dとの組合せと、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間には、有意な正の関連性（頸動脈内膜中膜複合体肥厚度増加させる方向の関連性）を有すことから、この複数の遺伝子多型の組合せを含むものはこの要件を満たす。

ここで、有意な相関性を有するか否かを判断する場合の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の測定値には、高解像度超音波断層装置による測定値を用いる。頸動脈内膜中膜複合体肥厚度としては、測定された頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の一被測定者における平均値である平均肥厚度（IMT）の値、および、測定された頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の一被測定者における最大値である最大肥厚度（PIMT）の値のいずれかを用いることとする。

また、有意な関連性を有するとは、統計学上一般的な仮説検定により、有意水準を0.05として検定された結果により有意である場合、有意性の経験的な値である、重回帰分析における頸動脈内膜中膜複合体の平均肥厚度の増分（ $\Delta$ IMT）が0.2mm以上の場合、および、同様に有意性の経験的な値である、重回帰分析における頸動脈内膜中膜複合体の最大肥厚度の増分（ $\Delta$ PIMT）が0.3mm以上の場合の少なくともいずれかに該当する場合をいう。

また、前記複数の遺伝子多型の組合せの選択およびセット数の選択に関しては、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも少なくとも0.2mm厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、少なくとも150例の動脈硬化疾患例集団において、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せを有する例が30%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%以上となり、少なくとも150例の非動脈硬化疾患例集団において

、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せを有する例が15%以下となるように、複数の遺伝子多型の組合せが選択されることが好ましい。

また、同様の条件において、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せを有する例が30%以上となり、少なくとも150例の非動脈硬化疾患例集団において、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せを有する例が10%以下となるように、選択されることも好ましい。

また、複数の遺伝子多型の組合せはを構成する遺伝子多型の数は、2から5個程度が好ましい。遺伝子多型6個以上の組合せであっても、用いることはできるが、動脈硬化疾患例において、該組合せの総計がカバーできるパーセンテージがあまり増えない反面、対照例において該組合せを有しているパーセンテージが上昇してくる傾向にあるため、危険度の誤差が却って大きくなる可能性がある。また、組合せを構成する多型数が増えると、優位さを有する組合せは著しく増えるが、個々の組合せの頻度が著しく下がるため、解析が煩雑になる点で不利である。

複数の遺伝子多型の組合せが、少なくとも3個の遺伝子多型からなるものから選択することもできる。

前記複数の遺伝子多型は、下記のa)から1)のいずれかの群に属する少なくとも二つの遺伝子多型を含むことが好ましく、三つ以上遺伝子多型を含むことがさらに好ましい。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) TNF- $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群
- f) IRS-1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- g) FABP2 遺伝子に関連する遺伝子多型群

- h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
- i)  $\text{NADP} \cdot \text{NADPH}$ 酸化酵素  $\text{p}22\text{phox}$  に関連する遺伝子多型群
- j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) に関連する遺伝子多型群
- k) 熱ショックタンパク質 70-1 に関連する遺伝子多型群
- l)  $\text{TGF}-\beta 1$  遺伝子に関連する遺伝子多型群

ここで、或る遺伝子に関連する遺伝子多型群とは、該遺伝子のエクソン、イントロンに存在する多型に限られず、プロモータ領域、3' 非翻訳領域、5' 非翻訳領域等に存在する多型も含まれる。一般にコーディング領域中の多型は、アミノ酸配列を変化させたり、mRNAの発現量を変化させる場合があるし、調節領域中の多型であっても、mRNAの発現量を変化させたり、スプライシングを変化させる場合があり、いずれも、タンパク質の発現量や、性質を変化させる可能性がある。

前記a)からl)のいずれかの群に属する遺伝子多型の具体例としては、例えば表1-1から表1-4中に記載の遺伝子多型が挙げられるが、これに限られない。

なお、前記a)からl)の群のうち、d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群、f)  $\text{IRS}-1$  遺伝子に関連する遺伝子多型群、h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群、および、i)  $\text{NADP} \cdot \text{NADPH}$ 酸化酵素  $\text{p}22\text{phox}$  に関連する遺伝子多型群は、インスリン抵抗性・血管内皮機能関連としてまとめて捉えることができ、e)  $\text{TNF}-\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群、k) 熱ショックタンパク質 70-1 に関連する遺伝子多型群、および、l)  $\text{TGF}-\beta 1$  遺伝子に関連する遺伝子多型群は、炎症反応関連としてまとめて捉えることができ、a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群は、交感神経血圧関連として捉えることができ、b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群、および、j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素に関連する遺伝子多型群は、凝固線溶系関連としてまとめて捉えることができ、c) 脂質に関連する遺伝子多型群、および、g)  $\text{FABP}2$  遺伝子に関連する遺伝子多型群は、脂質関連としてまとめて捉えて、下記のように分類することもできる。

- (A) インスリン抵抗性・血管内皮機能関連
- (B) 炎症反応
- (C) 接着因子
- (D) 交感神経血圧
- (E) 凝固線溶系
- (F) 脂 質

レニン・アンジオテンシン系の各構成要素の遺伝子は、血管や心筋において確認されており、動脈硬化や心肥大、血管や心筋のリモデリングにおいて重要な働きをしていると報告されている。したがって、レニン・アンジオテンシン系の各構成要素の遺伝子に関連する多型は本発明に好適に用いられる。

内皮細胞下における血小板と血管障害部位との結合に関与する、血小板表面のGP (グリコプロテイン) I b、IXレセプターやvWF (von Willebrand factor) に関する遺伝子、血小板表面のフィブリノーゲンレセプターであるGPII b、IIIaに関する遺伝子等に関連する多型は、血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群に属する多型として本発明に好適に用いられる。

また、凝固因子としては凝固第VII因子や、血清フィブリノーゲン濃度と優位に関連するとの報告もあるフィブリノーゲンβ鎖の遺伝子に関する多型なども血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群に属する多型として本発明に好適に用いられる。

一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群、TNF-α遺伝子に関連する遺伝子多型群、IRS-1遺伝子に関連する遺伝子多型群、FABP2遺伝子に関連する遺伝子多型群、筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群は、インスリン抵抗性に関与することが知られている。

また、MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) は、ホモシステインの代謝酵素であり、血中ホモシステイン濃度の上昇は心血管疾患の独立した危険因子であるとの報告がある。

前記複数の遺伝子多型が、互いに前記a) ~ l) の異なる群に属する少なくとも二つの遺伝子多型を含むことが、危険度に対する組合せによる相加効果または

相乗効果を生じさせやすく、危険度に対する寄与が大きい点で特に好ましい。さらに、複数の遺伝子多型が、互いに前記 a) ~ l) の異なる群に属する少なくとも三つの遺伝子多型を含むことも特に好ましい。

前記複数の遺伝子多型としては、血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型と、レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) に関連する遺伝子多型群、および、脂質に関連する遺伝子多型群の少なくともいずれかに属する遺伝子多型とを少なくとも含む場合が危険度に対する寄与が大きい点で特に好ましい。また、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) に関連する遺伝子多型群と、脂質に関連する遺伝子多型群とを少なくとも含む場合も好ましい。

前記血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型としては、PAI-1 遺伝子に関連する遺伝子多型が好適に用いられる。また、前記レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型としては、ACE 遺伝子に関連する遺伝子多型が好適に用いられる。また、前記脂質に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型としては、HUMPONA 遺伝子に関連する遺伝子多型が好適に用いられる。

複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度は、集団において測定された動脈硬化危険度と、該複数の遺伝子多型の、組合せとの関係を解析することにより求めることができ、求められた数値により、あらかじめ、その組合せに固有の動脈硬化危険度を設定しておくことができる。

前記動脈硬化危険度は、頸動脈の肥厚度等を計測することにより求められる頸動脈硬化の種々の公知の指標の中から、目的により適宜選択して用いることができる。前記頸動脈の肥厚度の計測法としては、特に制限はないが、超音波的に到達可能な頸動脈の肥厚度を計測する無侵襲なかつ定量的計測法である超音波断層装置による頸動脈内膜中膜複合体肥厚度 (IMT) の測定が一般的である。前述した頸動脈内膜中膜複合体肥厚度 (IMT) の測定法はその一例であるが、前記動脈硬化危険度を定めるための測定法としては、これに限られない。

前記超音波断層装置は、7.5 MHz 以上の中心周波数のリニア型パルスエコ

プローブを有するものを使用することが望ましい。頭蓋外頸動脈は皮下浅層に存在するため、7.5 MHz以上の周波数のものが使用可能で、高解像度（距離分解能0.1 mm）を得ることができる。

血管壁は、血管内腔側の1層の低エコー輝度部分と、その外の高エコー輝度層の2層構造としてエコー像上解析される。著者らは104例の健常例の観察より、IMTが10歳代より70歳代まで加齢とともにほぼ直線的に増加し、その肥厚度は1.1 mmを越えないことを確認している。健常人のIMTを年齢より次式の如く求めている。

$$IMT = 0.08 \times Age + 0.3 \quad (3 < Age < 80 \text{ yr}) \quad [1]$$

前記動脈硬化危険度を表すことができる頸動脈の動脈硬化の種々の公知の指標としては、IMTの最大値を表す最大IMT (Max-IMT)、IMTの平均値を表す平均IMT (Avg IMT)、プラークスコア (PS)、頸動脈スティッフネス等があり、未だ一定の指標が決定されていない。さらに、それぞれの指標について、種々の計測方法がある。

前斜位、側面、後斜位の各縦断像で最大の内膜中膜肥厚度をMax IMTとし、該Max IMTを示す部位を中心として中枢側1 cmおよび遠位側1 cmの計3ポイントの平均をAvg IMTとする研究者や、左右の総頸動脈 (common carotid:CC) から頸動脈分岐部、内頸動脈 (internal carotid:IC) の3縦断面の皮膚に対する近位壁 (near wall) および遠位壁 (far wall) の合計12の肥厚度の中、最大値をAvg IMTとする研究者、また、左右の肥厚度の平均をAvg IMTとする研究者もいる。さらに、far wallの一定区画の平均肥厚度をmean IMTとすることもある。また、一側の頸動脈の分岐部より中枢側10 mmのfar wallの肥厚度を指標とすることもある。

プラークスコア (PS) は、分岐部を基準として15 mmずつ頸動脈を4区画に区分し、各々の部位での1.1 mm以上のプラーク厚の左右頸動脈両方での総和をいう。また、上述の3～4区画の各部位でのプラーク (IMT 1.1 cm以上) の数の総和をプラークナンバー (PN) と呼んで指標とすることもある。

頸動脈スティッフネスは、収縮期および拡張期の頸動脈の径から計測される数



値である。

一側の頸動脈の分岐部より中枢側10mmのfar wallの肥厚度を指標とする方法は、測定が簡便であり、総頸動脈には病変が少ないことより測定誤差が少ないといわれる。IMTは、頸動脈の最大の病変を示す指標である。PSは、動脈硬化の進展した頸動脈の全体像を示すことができるが、非進展例（肥厚度が1.1mm未満）では、0となる点で不利である等、測定する対象、疾患により好適な指標が異なる。糖尿病や高脂血症を伴う場合には、頸動脈壁は比較的均一に肥厚することが多く、Avg IMTやmean IMTが重要な指標になるが、高血圧症を伴う場合は、プラークを認めることが多く、PS、PNおよびMax IMTが有効な指標となる。

前記複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度は、前述のように頸動脈の動脈硬化の種々の公知の指標を用いて設定することができるが、例えば、該組合せと頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有するか否か（例えば1か0か）での設定や、該組合せと頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する頻度のオッズ比での設定等が好適に挙げられる。また、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加量で設定されることも、総合的な動脈硬化性疾患危険度を表すものとして好ましい。頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加量としては、平均IMTの増分( $\Delta$ IMT)および最大IMTの増分( $\Delta$ PI-MT)等を用いることができ、 $\Delta$ IMTは、総合的な動脈硬化性疾患危険度を表すものとして特に好ましい。頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加量と動脈硬化性疾患との関連性については、多くの報告がされており、特に $\Delta$ IMTについては、 $\Delta$ IMTが0.339mm増加するごとに心筋梗塞のオッズが4.9倍になることが知られており(Yamasaki, Diabetes Care 2000 (9))、 $\Delta$ IMTを動脈硬化危険度として用いた態様は、極めて有効に動脈硬化性疾患の危険度を判定するものである。前述のように頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加量は、そのまま動脈硬化危険度として用いて動脈硬化性疾患の危険度を表すものとなり得るし、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加量から、適宜関数を用いて動脈硬化危険度を算出するようにしてもよい。

前記頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加量 ( $\Delta$  I M T および  $\Delta$  P I M T 等) は、集団より計測された I M T 値または P I M T 値から重回帰分析の方法により計算される偏回帰係数により表すことができる。

前記遺伝子多型による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程は、複数あってもよい。すなわち、複数のセットの前記複数の遺伝子多型からそれぞれ、動脈硬化危険度を決定してもよい。

前記危険度決定工程が単一の場合には、該工程により決定された動脈硬化危険度をそのまま動脈硬化性疾患危険度とすることができる。また、前記危険度決定工程が2つ以上の場合には、該工程により決定された動脈硬化危険度を総合して線形演算することにより、動脈硬化性疾患危険度とすることができる。

本発明の動脈硬化性疾患危険度判定方法は、環境因子に固有の動脈硬化危険度に基づき、被験対象の該環境因子の情報から該環境因子による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程をさらに含むことができる。

前記環境因子としては、年齢、性別、高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満、喫煙、ヘモグロビン A 1 c 値等が報告されている。

また、Vitelli らは、動脈硬化危険度調査 (A R I C S t u d y) において、208例の頸動脈肥厚を有する (平均 I M T、1.21 mm) 非糖尿病患者と208例の肥厚を有さない (平均 I M T、0.63 mm) 非糖尿病患者を比較し、ヘモグロビン A 1 c の1%の増加が動脈硬化のリスクを1.77倍高めるとの推計結果を報告している [Vitelli LL. Diabetes Care 1997; 20: 1454-8]。

喫煙は動脈硬化の危険因子とされているが、住民を対象とした動脈硬化危険度調査 (A R I C S t u d y) で喫煙歴と I M T の強い相関性が示され、糖尿病あるいは高血圧患者では喫煙がさらに強い促進因子となることを示された [Howard G, JAMA 1998; 279: 119-24.]。

S u t t o n - T y r r e l l らは、同年代の閉経前と閉経後女性の I M T とプラーク病変を検索し、閉経により平均 I M T は0.69→0.77 mm、プラークを認める女性は25→54%へと有意に増加することより、閉経が女性の動脈硬化を促進することを報告している [Sutton-Tyrrell K, Stroke 1998; 29: 11

16-21]。

動脈硬化の原因として種々の感染症の関与が考えられている。Nietoらは、動脈硬化危険度調査（ARIC Study）でIMT進展群と非進展群を抽出し、サイトメガロウイルスの抗体価を検索したところ、抗体価が20以上の症例の抗体価4未満群に対するオッズ比は5.3と有意に高く、動脈硬化の進展因子としてのサイトメガロウイルスの可能性を示唆している[Nieto FJ, Circulation 1996; 94: 922-7]。

著者らは以前に、1型糖尿病、2型糖尿病、境界型症例のIMTを従属変数として重回帰分析を行い、1型糖尿病患者（30才未満）では、年齢、糖尿病罹病期間、ヘモグロビンA1c値が独立した危険因子であること、2型糖尿病患者（30才以上）では、年齢、ヘモグロビンA1c値、nonHDLコレステロール、収縮期血圧、喫煙歴が独立した危険因子であること、境界型糖尿病患者では、加齢以外に収縮期血圧、喫煙が危険因子であることを報告した[Yamasaki Y, Diabetes 1994; 43: 634-639]。

前記環境因子の中でも特に年齢、性別、糖尿病罹病期間およびヘモグロビンA1c値が重要である。これらの環境因子についても、これらの環境因子による前記頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加量を、動脈硬化危険度として用いることができる。

前記環境因子による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程は、複数であってもよい。

本発明の動脈硬化性疾患危険度判定方法は、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度に固有の動脈硬化危険度に基づき、実際に測定された被験対象の該頸動脈内膜中膜複合体肥厚度から頸動脈内膜中膜複合体肥厚度による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程をさらに含んでもよい。頸動脈内膜中膜複合体肥厚度に固有の動脈硬化危険度は、例えば被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度×1として設定することもできる。被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が直接測定されていれば、それだけで、測定時における動脈硬化性疾患の発病の危険性または進行状況は求められるが、本発明のように遺伝子多型の組合せによる危険度をさらに

組合せることにより、将来の発病の危険性および進行しやすさ等を含めた危険度を予測することができる点で優れている。特に、まだ測定時点においては肥厚が進んでいない若年齢の被験対象において、将来の危険度を予測できれば、危険度が高い場合には生活習慣の改善などの予防を行うことができ、動脈硬化性疾患の発病を防ぐことができる。

前記動脈硬化性疾患危険度判定方法が、環境因子による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程や、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程等を含む複数の危険度決定工程を有する場合には、該危険度決定工程ごとに求められる動脈硬化危険度を総合して線形演算することにより、動脈硬化性疾患危険度を算出する動脈硬化性疾患危険度算出工程を含むことができる。

本発明の動脈硬化性疾患危険度判定方法は、単一の遺伝子多型では、危険度に有意な影響を与えない場合でも、複数の遺伝子多型が組み合わさって存在することにより、危険度に相加的のみならず相乗的な影響をあたえるという発明者らの知見に基づき、遺伝子多型を組合せて前記動脈硬化性疾患危険度に影響を与える危険因子として捉えたことによるものであり、これにより精度の高い判定が可能となった。前記動脈硬化性疾患危険度判定方法は、遺伝子多型と、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度という健常者においても疾患を有する者においても同様に定量的に計測可能な指標との関係を精査することにより、実現可能となった判定方法である。

#### (動脈硬化性疾患危険度測定方法)

本発明の動脈硬化性疾患危険度測定方法は、被験対象の複数の遺伝子多型の遺伝子型を検出する検出工程と、複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度に基づき、前記検出工程で検出された被験対象の遺伝子多型の遺伝子型から、遺伝子多型による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程とを含み、前記複数の遺伝子多型の少なくとも一の組合せが、該複数の遺伝子多型の組合せと、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な関連性を有すること以外は特に制限はない。

前記検出工程においては、対象者の複数の遺伝子多型の遺伝子型を検出する方法であればいかなる方法も使用することができる。一般的な方法としては、対象者の血液、痰、皮膚、気管支肺胞洗浄液、その他の体液、あるいは組織等、DNAを含むものを検体として用いる。解析方法としては多くの方法が知られているが、以下に代表的なものを挙げる (Clin. Chem. 43:1114-1120, 1997)。シーケンス法とは、遺伝子多型を含むDNA領域を直接にシーケンスする方法である。PCR法においては、遺伝子多型に特異的なプライマーをもちいて、ある遺伝子多型のみを特異的に増幅する。PCR法においては、もっとも3'側に遺伝子多型の核酸を配置するのが一般的であるが、Allele Specific Primer (ASP) - PCR法のように、3'末端側から2番目に遺伝子多型を有するプライマーを配置する方法などのように、遺伝子多型をプライマーのどの領域に置くか、また、検出する遺伝子以外にどのような核酸配列を入れるかなどプライマーのデザインには、遺伝子多型を識別できる限りとくに制限はない。TaqMan法において蛍光色素と消光物質により両端を標識したアレル特異的プローブを標的部位にハイブリダイズさせて、この部位を含む領域を増幅するように設計したプライマーでPCR反応を行う。プライマーからのPCR反応がこのアレル特異的プローブがハイブリダイズした領域に達すると、Taqポリメラーゼの5プライムヌクレアーゼ活性によりハイブリダイズしたプローブの5'末端に存在する蛍光色素が切断され、消光物質から離れることにより蛍光が生ずる。この手法により、アレル特異的プローブがどの程度ハイブリダイズしていたかがわかる。インベーターアッセイ法においては、鋳型の遺伝子多型部位から5'側に特異的配列を持ち、3'側にフラップ配列を持つアレルプローブと、鋳型の遺伝子多型部位からの3'側の特異的配列を有するインベータープローブ、さらに、フラップ配列に相補的な配列を含むFRETプローブとの3種類のオリゴヌクレオチドを使い、TaqMan法と同様の原理にてどのアレルプローブがハイブリズダイズし手かを特定できる。MALDI-TOF/MS法においては、遺伝子多型部位に隣接するプライマーを作成してこの領域を増幅させた後、遺伝子多型部位の1塩基のみをddNTPを用いて増

幅する。ついで、MALDI-TOF/MSを用いて、付加したddNTPの種類を識別することにより遺伝子多型を同定する。Hybrigen法などのDNAチップ法と総称される方法においては、マイクロアレイ上に遺伝子多型を含むオリゴヌクレオチドプローブを配置し、PCR増幅させたサンプルDNAとのハイブリダイゼーションを検出する。その他にも分子ビーコン法、ライゲーション法等が公知の方法として例示できる。

前記危険度決定工程については、前記動脈硬化性疾患危険度判定方法において述べた工程と同様の工程を用いることができる。

#### (動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法)

本発明の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法は、被験対象の遺伝子多型のうち、動脈硬化関連遺伝子多型セットにかかる複数の遺伝子多型の遺伝子型を選択的に明らかにすることにより、該被験対象の遺伝子多型における動脈硬化関連遺伝子多型セットを顕在化させる顕在化工程を含み、

該動脈硬化関連遺伝子多型セットが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せであり、動脈硬化性疾患関連因子であること以外には特に制限はなく、顕在化工程を含む限りにおいて、他の付加的ないかなる工程を有しているの本発明に含まれる。

ヒトゲノムには、極めて多くの遺伝子多型があり、そのうちのひとつだけでは、オッズ比が低く、また、頻度も限られているため、動脈硬化危険度を予測することは不可能である。したがって、それらの遺伝子多型をばらばらに見ていたのでは、個人が有する遺伝子多型のなかに組合せとして内在している動脈硬化と関連する因子を見つけることはできない。本発明において多数の母集団における解析により、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せが存在することが明らかになったことに基づき、それらの動脈硬化関連遺伝子多型セットを動脈硬化性疾患関連因子として位置づけ、被験試料の、これらの特定の組合せにかかる遺伝子多型を選択的に明らかにして、それらを一体と扱ったときに、はじめて、動脈硬化性疾患関連因子を顕在化させることができる。

顕在化された動脈硬化性疾患関連因子は、動脈硬化性疾患危険度判定の情報として、極めて価値が高いものである。

ここで、選択的に明らかにするとは、無数の遺伝子多型の組合せのうち特定のものを選択して明らかにすることである。

また、顕在化工程としては、単に、該複数の遺伝子多型の、組合せにかかる遺伝子型のセットを一体として明らかにすることのほか、選択的に明らかにされた複数の遺伝子多型の遺伝子型が、動脈硬化関連遺伝子多型セットに該当するか否か（例えば0か1か）により、また、選択的に明らかにされた複数の遺伝子多型の遺伝子型が、動脈硬化関連遺伝子多型セットに該当する場合に、動脈硬化関連遺伝子多型セットに固有の、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する頻度のオッズ比により、表わすことも含まれる。また、選択的に明らかにされた複数の遺伝子多型の遺伝子型が、動脈硬化関連遺伝子多型セットに該当する場合に、動脈硬化関連遺伝子多型セットに固有の頸動脈内膜中膜肥厚度増加量により表わすことも含まれ、該被験対象の遺伝子多型における動脈硬化関連遺伝子多型セットを顕在化できる方法であれば、特に制限は無い。

また、前記動脈硬化関連遺伝子多型セットとしては、上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを含むものであることが好ましい。

また、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも少なくとも0.2mm厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、少なくとも150例の動脈硬化疾患例集団において、少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを有する例が30%以上となり、少なくとも150例の非動脈硬化疾患例集団において、少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを有する例が15%以下となるように、動脈硬化関連遺伝子多型セットが選択されることが特に好ましい。

動脈硬化関連遺伝子多型セットは、2から5個の少なくともいずれかの遺伝子多型からなることが好ましく、動脈硬化関連遺伝子多型セットが、少なくとも3

個の遺伝子多型からなるものであってもよい。

動脈硬化関連遺伝子多型セットが、下記のa)からl)のいずれかの群に属する少なくとも二つの遺伝子多型を含むことも好ましい。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) TNF- $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群
- f) IRS-1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- g) FABP2 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
- i) NADP・NADPH酸化酵素 p22phox に関連する遺伝子多型群
- j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素に関連する遺伝子多型群
- k) 熱ショックタンパク質70-1に関連する遺伝子多型群
- l) TGF- $\beta$ 1 遺伝子に関連する遺伝子多型群

また、被験対象の複数の遺伝子多型の遺伝子型を検出する検出工程を顕在化工程前にさらに含んでいてもよい。

#### (遺伝子多型検出方法)

本発明の遺伝子多型検出方法は、上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子多型について、被験対象の遺伝子型を検出する工程を含み、検出結果が動脈硬化性疾患危険度判定のために用いられるものであれば特に制限はない。

#### (遺伝子マーカー)

本発明の遺伝子マーカーは、上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子多型を含むものであれば、特に制限はない。該遺伝子多型の組合せを動脈硬化性疾患の各種マーカーとして用いる態様である。



(遺伝子多型分析用キット)

本発明の遺伝子多型分析用キットは、上記表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子の特異的に増幅し得るプライマー対あるいは遺伝子に特異的にハイブリダイズし得る核酸プローブを含み、少なくとも一の表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットを検出するものであれば、どのようなものでもよい。

上記表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを検出するためには、該遺伝子多型セットにかかる遺伝子多型 (表 2-1 から表 2-2) に記載の遺伝子多型から選択された少なくとも 2 個の遺伝子多型の遺伝子多型検出用プライマーおよびプローブのいずれかを有することが必要である。一つの遺伝子多型について遺伝子多型検出用プライマーを含み、他の遺伝子多型について遺伝子多型検出用プローブを含むようなものであっても、前記複数の遺伝子多型を分析できる限り、本発明の遺伝子多型分析用キットに含まれる。表 2-1 から表 2-2 中に記載の各遺伝子多型の検出は上記遺伝子多型検出工程に記載したいずれの方法をも用いることができるが、PCR を用いる *hybrigen* 法、*TaqMan* 法、インベーター法や、遺伝子多型を有する遺伝子に特異的にハイブリダイズする核酸プローブを用いる *ASP-PCR* 法などを好適に用いることができる。したがって、遺伝子多型分析用キットには、これらの遺伝子多系を検出する工程に用いるプライマーおよびプローブの少なくともいずれかが含まれる必要がある。遺伝子多型を検出するための PCR 法においては、もっとも 3' 側に遺伝子多型の核酸を配置するのが一般的であるが、*Allele Specific Primer (ASP) - PCR* 法のように、3' 末端側から 2 番目に遺伝子多型を有するプライマーを配置する方法などのように、遺伝子多型をプライマーのどの領域に置くか、また、検出する遺伝子以外にどのような核酸配列を入れるかなどプライマーのデザインには、遺伝子多型を識別できる限りとくに制限はない。プローブのデザインにおいても同様に、遺伝子多型を識別できる限りその配列に

制限なく用いることができる。

なお、遺伝子多型分析用キットにて検出される動脈硬化関連遺伝子多型セットは、上記表 1-1 から表 1-4 中に記載のものであればどれでもよいが、3 つ以上の遺伝子多型を含むグループは、危険度検出の感度を高めるので好ましい。

さらに、表 2-1 から表 2-2 中に記載の遺伝子多型から選択された少なくとも 2 個の遺伝子多型の遺伝子多型検出用プライマーまたはプローブを有し、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも 0.2 mm 以上厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、少なくとも 150 例の動脈硬化疾患例集団において、該選択された遺伝子多型で構成され得る上記表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットにおける頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子型の組合せを有する例が 30% 以上となり、少なくとも 150 例の非動脈硬化疾患例集団において、15% 以下となるような動脈硬化関連遺伝子多型セットを検出するキットは、危険性予測において、好ましい。

また、表 2-1 から表 2-2 中に記載の遺伝子多型から選択された少なくとも 2 個の遺伝子多型についての遺伝子多型検出用プライマーまたはプローブを有し、

頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも 0.2 mm 以上厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、少なくとも 150 例の動脈硬化疾患例集団において、該選択された遺伝子多型で構成され得る上記表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットにおける頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子型の組合せを少なくとも一つ有する例が 50% 以上となり、少なくとも 150 例の非動脈硬化疾患例集団において、15% 以下となるような、分析キットは、危険性予測においてさらに好ましい。

また、前記分析用キットは、複数の遺伝子多型検出用プライマーまたはプローブが下記の a) から l) の互いに異なるいずれかの群に属するものであることも好ましい。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) TNF- $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群
- f) IRS-1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- g) FABP2 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
- i) NADP・NADPH酸化酵素 p22phox に関連する遺伝子多型群
- j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素に関連する遺伝子多型群
- k) 熱ショックタンパク質 70-1 に関連する遺伝子多型群
- l) TGF- $\beta$  1 遺伝子に関連する遺伝子多型群

(動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイ)

本発明の動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイは、上記表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子多型の、遺伝子多型検出用プローブを有すること以外は、本発明の効果を害さない限り、適宜公知の材料から選択して用いることができる。

前記動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイは、あらかじめ準備したプローブを基盤に固定する方法のほか、基板上で合成する Affimetrix 社の方法等が知られており、どのような方法に用いられるものであってもよい。また、プローブを固定する基板に特に制限はないが、ガラスプレートやフィルター等公知のものを用いることができる。また、固定されるプローブの長さや用いる核酸の種類も、遺伝子多型を検出できる限りにおいて、特に制限はない。遺伝子多型を含む領域は、あらかじめ PCR で増幅しておくことが感度の上から望ましい。特に、標識したプライマーを用いて遺伝子多型を含む領域を増幅する方法は、感度、簡便さ等の点から好適に用いることができる。たとえば、HybriGene 法においては、ビオチンにて標識したプライマーを用いて遺伝子多型を含む

領域を増幅し、これをマイクロアレイに添加してハイブリダイズさせたのちに、ハイブリダイズしなかった核酸を洗浄して除く。ついで、ハイブリダイズしたプローブを、アビジン標識した蛍光色素にて検出する。この方法により遺伝子多型が感度よく検出できる。

前記動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイは、該遺伝子多型検出用プローブが下記のa)からl)の互いに異なるいずれかの群に属する遺伝子多型検出用プローブであることも好ましい。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) TNF- $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群
- f) IRS-1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- g) FABP2 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
- i) NADP・NADPH酸化酵素 p22phox に関連する遺伝子多型群
- j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) に関連する遺伝子多型群
- k) 熱ショックタンパク質 70-1 に関連する遺伝子多型群
- l) TGF- $\beta$  1 遺伝子に関連する遺伝子多型群

(動脈硬化性疾患危険度判定装置)

本発明の動脈硬化性疾患危険度判定装置は、コンピューターを利用した動脈硬化性疾患危険度判定装置であって、複数の遺伝子多型の、組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルを有し、かつ、入力された、被験対象の複数の遺伝子多型の組合せと、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける複数の遺伝子多型の組合せとを照合し、一致する遺伝子多型の組合せがある場合に、該遺伝子多型の組合せに対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段を有すること以外は特に制限は無い。検出された前記頸動脈危険度はそのまま動脈硬化性疾患危険度として用いることもできるし、適宜簡単な数値

等に置き換えて動脈硬化性疾患危険度とすることもできる。

前記動脈硬化危険度データテーブルにおける複数の遺伝子多型が、該複数の遺伝子多型の少なくとも一の組合せと、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な関連性を有する複数の遺伝子多型であることが好ましい。

また、複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として1単位を対応させたものなども挙げられる。

さらに、複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比を対応させたものであってもよい。

頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子多型の組合せであることが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比が一定以上であること、および、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の平均値に有意差があること等により、好適に定義され得る。

また、本発明の動脈硬化性疾患危険度判定装置は、危険因子となる環境因子の情報を入力することによりさらに正確な動脈硬化性疾患危険度判定を行うため、環境因子の有無または数値と、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルと、

入力された、被験対象の環境因子の有無または数値と、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける環境因子の有無または数値とを照合し、該環境因子の有無または数値に対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段とをさらに有することもできる。

動脈硬化性疾患危険度判定装置が複数の検出手段を有する場合には、前記複数の検出手段から検出された複数の頸動脈危険度の加算値に基づき動脈硬化性疾患危険度を判定することもできる。

また、本発明の動脈硬化性疾患危険度判定装置は、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度と、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルと、

入力された、被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度と、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける頸動脈内膜中膜複合体肥厚度とを照合し、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度に対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段とをさらに有することもできる。

また、本発明の動脈硬化性疾患危険度判定装置は、前記検出手段から検出された頸動脈危険度および複数の前記抽出手段から抽出された頸動脈危険度の加算値が、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増分として表されている場合には、入力された、被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度をそのまま使用して、それらの加算値に基づき動脈硬化性疾患危険度を判定することもできる。

また、本発明の動脈硬化性疾患危険度判定装置は、被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度を測定して前記頸動脈内膜中膜複合体肥厚度を前記コンピューターに供給する血管膜圧測定手段をさらに含むことができる。該血管膜圧測定手段としては、コンピューターとは別の血管膜圧測定装置や、血管膜圧測定装置と解析用コンピューターを組合せた装置などが用いられる。該血管膜圧測定装置は、公知の血管膜圧測定装置から目的にあわせて適宜選択することができ、前記血管膜圧測定手段にコンピューターが含まれる場合には、前記血管膜圧測定手段のコンピューターと、データテーブルの記憶および危険度検出のための前記コンピューターが一体となってもよい。

#### (動脈硬化性疾患危険度判定プログラム)

本発明の動脈硬化性疾患危険度判定プログラムは、複数の遺伝子多型の、組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルをコンピューターに記憶させ、かつ、該コンピューターを、入力された、被験対象の複数の遺伝子多型の組合せと、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける複数の遺伝子多型の組合せとを照合し、一致する遺伝子多型の組合せがある場合に、該遺伝子多型の組合せに対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段とし

て機能させることを特徴とするものである。

複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルについては、前記動脈硬化性疾患危険度判定装置とで述べたものと同様な機能を有するものが挙げられる。

頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも少なくとも0.2 mm厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、少なくとも150例の動脈硬化疾患例集団において、動脈硬化危険度を少なくとも1単位有する例が30%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは60以上となり、少なくとも150例の非動脈硬化疾患例集団において、動脈硬化危険度を少なくとも1単位有する例が15%以下となる、ような動脈硬化性疾患危険度判定プログラムは、危険度判定の観点から極めて有用である。

#### 実施例

以下、本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例に何ら限定されるものではない。

#### (実施例1)

#### 遺伝子多型とIMTとの関係

200例の健常人および200例のII型糖尿病患者において頸動脈内膜中膜複合体肥厚度を測定し、それぞれの被測定者において平均IMTおよびピークIMT(PIMT)を得た。一方、該健常人および糖尿病患者から採取された血液からDNAをフェノールクロロホルム法により抽出した。得られたDNAを鋳型とし、公知のASP-PCR法と遺伝子多型特異的プライマーとを用いて表3に表されるACE、AGT、SERINE1、APOE、APOB、PON1、LOC113690、MTHFR、IRS1、FABP2の遺伝子多型を含むDNAを増幅した。アガロース電気泳動にてPCR産物の有無を確認することにより、各遺伝子多型を判別した。

頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の測定は、高解像度超音波断層装置により2方向から肥厚度を連続的に3点以上測定し、一被測定者の測定値の平均値を平均IM

T、測定値の最大値をピーク IMP とした。このデータから、線形重回帰分析の手法により、該単一の遺伝子多型について危険因子をホモに有する遺伝子型に固有の  $\Delta$  IMT および  $\Delta$  P IMT を算出した。ここで、 $\Delta$  IMT は、平均頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増分、 $\Delta$  P IMT は最大頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増分を表す。結果を表 5 に表す。

[表5]

番号	関連因子	symbol	人種差	$\Delta$ PIMT	$\Delta$ IMT
レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型					
4	ACE	ACE		0.54	0.08
5	アンジオテンシノーゲン	AGT		0.12	0.094
血小板機能・凝固系に関する遺伝子多型					
15	PAI-1	SERPINE1		0.3	0.12
脂質に関連する遺伝子多型					
16	アポタンパク質E	APOE		0.5	0.13
21	アポタンパク質B	APOB		0.52	0.13
24	HUMPONA	PON1		0.179	0.108
その他の因子					
29	p22phox	LOC113690			* 0.15
30	MTHFR	MTHFR	日本人 = 欧米人	0.49	* 0.29
33	IRS-1	IRS1	欧米人 >> 日本人	0.36	0.07
35	fatty acid binding protein	FABP2		0.48	0.08



$\Delta$  P I M Tと $\Delta$  I M Tの単位はミリメートル (mm) である。

表中、「\*」は $\Delta$  I M Tとの有意な関連性 (P値0.05未満) を表す。また、「番号」は、表3および表4における同一番号の遺伝子多型を表すよう付与されている。

この結果、単一の遺伝子多型では、MTHFRおよびp22phoxについて、 $\Delta$  I M T増加に有意に関与することが認められた。

次に、PON1とMTHFRとの、又は、PON1とSERPINE1との2つの遺伝子多型について危険因子をホモに有する遺伝子型同士の組合せに固有の $\Delta$  I M Tを算出した。

PON1とMTHFRとについて共に危険因子をホモに有する遺伝子型を有する場合の $\Delta$  I M Tは、\*0.301mmであった。また、PON1とSERPINE1とについて共に危険因子をホモに有する遺伝子型を有する場合の $\Delta$  I M Tは、0.16mmであった。

この結果、PON1とMTHFRとのような異なる機能に関与する複数の遺伝子多型が組合せて生じる場合には、単一の遺伝子多型の場合よりもさらに $\Delta$  I M Tに大きく関与することが認められ、これに基づき、より正確な危険度を設定することができることが分かった。また、PON1とSERPINE1との組合せの場合も、単一遺伝子多型の場合よりも $\Delta$  I M Tは大きくなったが、有意差を生じる程には増加しなかった。この組合せが、後述の実施例2の組合せ等と比較して、組合せによる $\Delta$  I M Tの増加が少ないのは、該遺伝子多型は表3の異なる多型群に属してはいるが、ともに動脈硬化に密接に関連する多型であるため、大きくは同じ分類に属するためと考えられる。

#### (実施例2)

3つの遺伝子多型の組合せとI M Tとの関係、および、動脈硬化性疾患危険度判定方法

次に、200例の健常者および200例のII型糖尿病患者において、同様に、3つの遺伝子多型を検出すると共にI M Tを測定し、重回帰分析により3つの遺伝子型の組合せに固有の $\Delta$  I M Tを求めた。

MTHFRを関連因子とするMTHFR遺伝子多型、ACEを関連因子とするACE遺伝子多型、および、PAI-1を関連因子とするSERPINE1遺伝子多型を複数の遺伝子多型の組合せとして選択し、それぞれの遺伝子多型について、危険因子をホモ型に含む遺伝子型（+）とそれ以外の遺伝子型（-）に分類した。そして、3つの異なる遺伝子型多型におけるこの分類を組合せて遺伝子多型の組合せに固有の $\Delta$ IMTを算出し、動脈硬化危険度とした。結果を表6に表す。

[表6]

遺伝子多型の遺伝子型(危険因子をホモに有する 遺伝子型を+とし、それ以外の遺伝子型を-とする)			$\Delta$ PIMT	$\Delta$ IMT	p値
MTHFR	ACE	SERPINE1			
+	-	-	測定せず	0.089	0.617
-	+	-	測定せず	-0.018	0.94
-	-	+	測定せず	0.145	0.179
+	+	-	0.69	0.451	0.125
+	-	+	0.34	0.318	*0.0135
-	+	+	0.22	0.127	0.3319
+	+	+	測定せず	0.771	**0.00007

即ち、MTHFR、ACE、および、SERPINE1のいずれの多型についても危険因子をホモ型に含む遺伝子型の組合せに固有の動脈硬化危険度を0.771と設定した。また、MTHFRとACEの両多型について危険因子をホモ型に含む遺伝子型であって、SERPINE1については危険因子をホモ型に含まない遺伝子型の組合せに固有の動脈硬化危険度を0.451と設定した。同様に、MTHFRとSERPINE1との両多型について危険因子をホモ型に含む遺伝子型であって、ACEについては危険因子をホモ型に含まない遺伝子型の組合せに固有の動脈硬化危険度を0.318と設定した。同様に、ACEとSERP

INE 1 との両多型について危険因子をホモ型に含む遺伝子型であって、MTHFR については危険因子をホモ型に含まない遺伝子型の組合せに固有の動脈硬化危険度を 0.127 と設定した。さらに、MTHFR、ACE および SERPINE 1 のいずれか一種のみ危険因子をホモ型に含む遺伝子型に固有の動脈硬化危険度をそれぞれ、0.089、-0.018 および 0.145 と設定した。最後に 3 種の多型いずれもが危険因子をホモ型に含まない遺伝子型の組合せに固有の動脈硬化危険度を 0 と設定した。前記あらかじめ設定される動脈硬化危険度に、被験対象の ACE、SERPINE 1 および MTHFR 多型の遺伝子型をあてはめて、被験対象の動脈硬化危険度を決定した。すなわち、もし被験対象の該三種多型がいずれも危険因子をホモ型に含む遺伝子型であれば、該被験対象の動脈硬化危険度は 0.771 と決定される。危険度決定工程が一つの場合には、この値をそのまま該被験対象の動脈硬化性疾患危険度とすることができる。

これらの結果から、本発明の動脈硬化性疾患危険度判定方法等において、これらの  $\Delta$  IMT の値を、複数の遺伝子多型の組合せに固有の動脈硬化危険度として予め設定することができ、被験対象の該複数の遺伝子多型の遺伝子型から動脈硬化危険度を決定し、動脈硬化性疾患危険度を高精度に判定することができる。

### (実施例 3)

#### 遺伝子多型以外の危険因子と IMT との関係

年齢、性別、糖尿病罹病期間、ヘモグロビン A1c 値について、それぞれ、200 例の健常者および 200 例の II 型糖尿病患者について、 $\Delta$  IMT との関係を重回帰分析により解析した。求められた偏回帰係数を以下に表す。

環境因子	偏回帰係数
年齢	+ 0.015 mm / y r
男性	+ 0.178 mm
糖尿病罹病期間	+ 0.006 mm / y r
ヘモグロビン A1c 値	+ 0.024 mm / %

これらの環境因子は、それぞれ独立に危険因子となり、本発明の動脈硬化性疾

患危険度判定方法は、これらの因子による危険度決定工程をさらに含むことができる。

例えば、環境因子のうち年齢および性別による危険度決定工程を含む場合は、判定被験対象が30歳であれば、年齢に固有の動脈硬化危険度は年齢×0.015であるから該判定被験対象の年齢による頸動脈効果危険度は0.45となる。該判定被験対象が男性であれば、環境因子のうち性別に固有の動脈硬化危険度は0.178である（女性の場合は0）。

該判定被験対象が前記実施例2の3つの遺伝子多型について、MTHFRとSERPINE1との両多型について危険因子をホモ型に含む遺伝子型であって、ACEについては危険因子をホモ型に含まない遺伝子型である場合は、この組合せに固有の動脈硬化危険度は0.318（表6）であるから、該判定被験対象の動脈硬化性疾患危険度は、下記式により求められる。

$$0.318 + 0.45 + 0.178 = 0.946$$

（実施例4）

次に、以上の結果に基づき、さらに大きな母集団で、動脈硬化などとの関連性が推測されている広範な既知の遺伝子多型の種々の組合せに関して検討し、動脈硬化関連遺伝子多型セットを決定し、疾患発症予測が可能かを検討した。

検索した遺伝子多型は、57遺伝子多型で多型頻度が1%以下のものを除外し、最終的に49遺伝子多型、表2-1から表2-2中に記載の47遺伝子を検索した。

これら遺伝子多型を動脈硬化発症要因別に以下の（A）から（G）のようにグループ化したところ表7-1から表7-2中のように分類でき、その数は以下のような内訳であった。

インスリン抵抗性・血管内皮機能関連	5種	（A）
炎症反応	9種	（B）
接着因子	4種	（C）
交感神経血圧	8種	（D）
凝固線溶系	11種	（E）

脂 質	8 種	(F)
その他	4 種	(G)

[表7-1]

多型 番号	遺伝子多型名	ref. SNP ID	文献 番号	配列 番号	遺伝子の Accession番号	分類
1	Enos(T-786C)		1		GDB:209976	A
2	Enos (Glu298Asp)	rs1799983				A
3	IRS-1(GLY971ARG)	rs1801278				A
4	glycogen_synthase(M416V)		2		GDB:134184	A
5	p22phox(C242T)		3		GDB:125238	A
6	interleukin6(C-634G)	rs3087226				B
7	TGF beta(T29C/Leu10Pro)		4		GDB:581114	B
8	TNF-alfa(g-308a)		25	1	GDB:1336833	B
9	mmp-9(C-1562T)		5		GDB:125224	B
10	MMP-12(A-82G)		6		GDB:266582	B
11	MCP-1(A-2518G)		7		GDB:125279	B
12	MPO(G-463A)		8		GDB:120192	B
13	fractalkine_receptor(V249I)	rs3732379				B
14	CRP(G1059C)		26	4	GDB:119071	B
15	connexin37(C1019T)		21		GDB:127818	C
16	E-selectin(Ser128Arg)		9		GDB:120612	C
17	ICAM1(E469K)	rs5498				C
18	E-selectin(G98T)		22		GDB:120612	C
19	Dopamine-D2receptor (Ser311Hys)	rs1801028				D
20	ACE(I/D)		23		GDB:119840	D
21	AT2-receptor(a1166c)	rs1064536				D
22	angiotensinogen(t704c)		10		GDB:118750	D
23	beta3 adrenoceptor(Trp64Arg)		27	3	GDB:203869	D
24	beta2 Adrenoreceptor(C79T)	rs1042714				D
25	beta-adrenergic receptor(A46G)	rs4997				D
26	HANP(T2238C)	rs5065				D
27	GPIIbIIIa(C1565T)		24			E
28	GPIa(A1648G)		11			E
29	HPA-2(Thr145Met)		28	5	GDB:11510064	E
30	GlycoproteinVI(Ser219Pro)	rs1613662			GDB:11500433	E

[表7-2]

多型 番号	遺伝子多型名	ref. SNP ID	文献 番号	配列 番号	遺伝子の Accession番号	分類
31	glycoproteinIa(C807T)		12		GDB:118806	E
32	Thrombomodulin(G-33A)		13		GDB:119613	E
33	FactorXII (C46T)	rs1801020				E
34	alfa-Fib(Thr312Ala)		29	6	GDB:119129	E
35	beta Fib(C148T)		14		GDB:119130	E
36	PAI-1(4G/5G)		15		GDB:120297	E
37	MTHFR(C677T)	rs1801133				E
38	ABCA1(G1051A)		16		GDB:305294	F
39	HUMPONA(MET55LEU)	rs854560				F
40	PON1(Gly192Arg)	rs662				F
41	PPAR_gamma(PRO12ALA)	rs1801282				F
42	hepatic_lipase(C-480T)		17		GDB:119366	F
43	Apo E(Cys112Arg)		30	2	GDB:119691	F
44	microsomal triglyceride transfer protein (G-493T)		31	7	GDB:228961	F
45	lipoprotein lipase(Ser447STOP)	rs328				F
46	Alfa_estrogen_receptor(PvuII in intron1)		18		GDB:119120	G
47	serotonin_2A_receptor(T102C)		19			G
48	Glutamate-cystein ligase(C-588T)		32	8	GDB:132915	G
49	matrilyn promoter(A-181G)		20			G

但し、表 2-1 から表 2-2 および表 7-1 から表 7-2 中の文献番号に対応する文献名は以下のとおりである。

1. Yoshimura M, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Nakamura S, Ito T, Mizuno Y, Harada E, Yasue H, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K. A T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary arterial vasomotility. *Am J Cardiol.* 2000 85(6):710-4.
2. Shimomura H, Sanke T, Ueda K, Hanabusa T, Sakagashira S, Nanjo K. A missense mutation of the muscle glycogen synthase gene (M416V) is associated with insulin resistance in the Japanese population. *Diabetologia.* 40(8):947-52.
3. Renner W, Schallmoser K, Gallippi P, Krauss C, Toplak H, Wascher TC, Pilger E. C242T polymorphism of the p22 phox gene is not associated with peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis.* 152(1):175-9.
4. Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. Increased Abdominal Obesity, Insulin and Glucose Levels in Nondiabetic Subjects with a T29C Polymorphism of the Transforming Growth Factor-beta(1) Gene. *Horm Res.* 59(4):191-4.
5. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 107(12):1579-85.
6. Hofmann MA, Drury S, Hudson BI, Gleason MR, Qu W, Lu Y, Lalla E, Chitnis S, Monteiro J, Stickland MH, Bucciarelli LG, Moser B, Moxley G, Itescu S, Grant PJ, Gregersen PK, Stern DM, Schmidt AM. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immun.* 3(3):123-35.
7. Omori K, Kazama JJ, Song J, Goto S, Takada T, Saito N, Sakatsume M,



- Narita I, Gejyo F. Association of the MCP-1 gene polymorphism A-2518G with carpal-tunnel syndrome in hemodialysis patients. *Amyloid*. 9(3):175-82.
8. Cascorbi I, Henning S, Brockmoller J, Gephart J, Meisel C, Muller JM, Loddenkemper R, Roots I. Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant--463A of the myeloperoxidase gene. *Cancer Res.* (3):644-9.
  9. Rauchhaus M, Gross M, Schulz S, Francis DP, Greiser P, Norwig A, Weidhase L, Coats AJ, Dietz R, Anker SD, Glaser C. The E-selectin SER128ARG gene polymorphism and restenosis after successful coronary angioplasty. *Int J Cardiol.* 83(3):249-57.
  10. Reinhardt D, Sigusch HH, Vogt SF, Zeiss C, Farker K, Hoffmann A, Muller S. A common variant of the angiotensinogen gene and the risk of coronary artery disease in a German population. *Pharmazie.* 55(1):69-71.
  11. Kroll H, Gardemann A, Fechter A, Haberbosch W, Santoso S. The impact of the glycoprotein Ia collagen receptor subunit A1648G gene polymorphism on coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 83(3):392-6.
  12. von Beckerath N, Koch W, Mehilli J, Bottiger C, Schomig A, Kastrati A. Glycoprotein Ia gene C807T polymorphism and risk for major adverse cardiac events within the first 30 days after coronary artery stenting. *Blood.* 95(11):3297-301.
  13. Park HY, Nabika T, Jang Y, Kwon HM, Cho SY, Masuda J. Association of G-33A polymorphism in the thrombomodulin gene with myocardial infarction in Koreans. *Hypertens Res.* 25(3):389-94.
  14. Blake GJ, Schmitz C, Lindpaintner K, Ridker PM. Mutation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene and the risk of future myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. *Eur Heart J.*

15. Jeng JR. Association of PAI-1 gene promoter 4g/5g polymorphism with plasma PAI-1 activity in Chinese patients with and without hypertension. *Am J Hypertens*. 16(4):290-6.
16. Cenarro A, Artieda M, Castillo S, Mozas P, Reyes G, Tejedor D, Alonso R, Mata P, Pocovi M, Civeira F. A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet*. 40(3):163-8.
17. Jansen H, Chu G, Ehnholm C, Dallongeville J, Nicaud V, Talmud PJ. The T allele of the hepatic lipase promoter variant C-480T is associated with increased fasting lipids and HDL and increased preprandial and postprandial LpCIII:B : European Atherosclerosis Research Study (EARS) II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19(2):303-8.
18. Yamada Y, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density of the femoral neck in elderly Japanese women. *J Mol Med*. 80(7):452-60.
19. Bjork JM, Moeller FG, Dougherty DM, Swann AC, Machado MA, Hanis CL. Serotonin 2a receptor T102C polymorphism and impaired impulse control. *Am J Med Genet*. 114(3):336-9.
20. Jormsjo S, Whatling C, Walter DH, Zeiher AM, Hamsten A, Eriksson P. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-7 promoter activity is associated with coronary artery luminal dimensions among hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21(11):1834-9.
21. Yeh HI, Chou Y, Liu HF, Chang SC, Tsai CH. Connexin37 gene polymorphism and coronary artery disease in Taiwan. *Int J Cardiol*. 81(2-3):251-5.

22. Zheng F, Chevalier JA, Zhang LQ, Virgil D, Ye SQ, Kwiterovich PO. An HphI polymorphism in the E-selectin gene is associated with premature coronary artery disease. *Clin Genet.* 59(1):58-64.
23. Wang AY, Chan JC, Wang M, Poon E, Lui SF, Li PK, Sanderson J. Cardiac hypertrophy and remodeling in relation to ACE and angiotensinogen genes genotypes in Chinese dialysis patients. *Kidney Int.* 63(5):1899-907.
24. Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rubsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, Hiller E, Thaler CJ. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol.* 46(2):124-31.
25. Krikovszky D, Vasarhelyi B, Toth-Heyn P, Korner A, Tulassay T, Madacsy L. Association between G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha gene and 24-hour ambulatory blood pressure values in type 1 diabetic adolescents. *Clin Genet.* 62(6):474-7.
26. Cao H, Hegele RA. Human C-reactive protein (CRP) 1059G/C polymorphism. *J Hum Genet.* 45(2):100-1.
27. Okumura K, Matsui H, Ogawa Y, Takahashi R, Matsubara K, Imai H, Imamura A, Mizuno T, Tsuzuki M, Kitamura Y. The polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene is associated with reduced low-density lipoprotein particle size. *Metabolism.* 52(3):356-61.
28. Simsek S, Bleeker PM, van der Schoot CE, von dem Borne AE. Association of a variable number of tandem repeats (VNTR) in glycoprotein Ib alpha and HPA-2 alloantigens. *Thromb Haemost.* 72(5):757-61.
29. Carter AM, Catto AJ, Kohler HP, Ariens RA, Stickland MH, Grant PJ. alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism. *Blood.* 96(3):1177-9.
30. Huber G, Marz W, Martin JR, Malherbe P, Richards JG, Sueoka N, Ohm

T, Hoffmann MM. Characterization of transgenic mice expressing apolipoprotein E4(C112R) and apolipoprotein E4(L28P; C112R). Neuroscience. 101(1):211-8.

31. Couture P, Otvos JD, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM. Absence of association between genetic variation in the promoter of the microsomal triglyceride transfer protein gene and plasma lipoproteins in the Framingham Offspring Study. Atherosclerosis. 148(2):337-43.
32. Nakamura S, Kugiyama K, Sugiyama S, Miyamoto S, Koide S, Fukushima H, Honda O, Yoshimura M, Ogawa H. Polymorphism in the 5'-flanking region of human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with myocardial infarction. Circulation. 25;105(25):2968-73.

また、表 2-1 から表 2-2 および表 7-1 から表 7-2 中に記載の配列番号に対応する遺伝子配列は図 1 および 2 に表すとおりである。

糖尿病患者で、心筋梗塞病歴のない母集団において、早期動脈硬化を有する約 437 例について、早期動脈硬化を有さない約 195 例を対照にケースコントロールスタディーを行った。心筋梗塞病歴のない母集団について検索したのは、心筋梗塞病歴のある集団では、心筋梗塞と関連性がある心筋梗塞関連遺伝子が混じって検出されることにより、動脈硬化に特異的な遺伝子多型セットの感度が悪くなることを避けるためである。これにより、動脈硬化に特異的で、動脈硬化危険性を高く予測できる動脈硬化関連遺伝子多型セットが得られた。

実施例 1 と同様の測定法により測定した IMT が、健常人の平均 IMT より 0.2 mm 以上厚い場合 ( $SD = 0.1$ ) について、早期動脈硬化を有する群として分類した。有意水準をオッズ比 10 以上かつカイ二乗値 6.635 ( $P < 0.01$ ) 以上として動脈硬化関連遺伝子多型セットを決定した (表 8-1 から表 8-4)。

[表8-1]

疾患	番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類	頻度	Odd比	Kai二乗値
IMT	3	1_2	46	1_2					0.034	99	6.63
IMT	1	3	21	1	28	1_2			0.067	13.1	10.51
IMT	1	3	28	1_2	29	1			0.064	12.4	9.82
IMT	1	3	28	1_2	40	1_2			0.053	10.3	7.82
IMT	1	3	28	1_2	34	2_3			0.057	10.7	8.25
IMT	3	1_2	4	1	7	2_3			0.036	99	6.88
IMT	3	1_2	7	2_3	17	1_2			0.041	99	7.56
IMT	3	1_2	7	2_3	31	1_2			0.038	99	7.35
IMT	3	1_2	7	2_3	34	1_2			0.045	99	8.38
IMT	3	1_2	8	3	46	1_2			0.034	99	6.64
IMT	3	1_2	9	1_2	46	1_2			0.035	99	6.64
IMT	3	1_2	12	2_3	31	1_2			0.055	10.3	7.86
IMT	3	1_2	12	2_3	46	1_2			0.039	99	7.13
IMT	3	1_2	13	2_3	46	1_2			0.034	99	6.64
IMT	3	1_2	14	2_3	46	1_2			0.035	99	6.73
IMT	3	1_2	15	1_2	25	1_2			0.052	10.1	7.68
IMT	3	1_2	15	1_2	46	1_2			0.034	99	6.64
IMT	3	1_2	22	1_2	31	1_2			0.055	10.5	8.05
IMT	3	1_2	24	1_2	46	1_2			0.035	99	6.71
IMT	3	1_2	25	1_2	31	1_2			0.047	99	9.06
IMT	3	1_2	26	3	46	1_2			0.035	99	6.72
IMT	3	1_2	28	2_3	31	1_2			0.051	10	7.61
IMT	3	1_2	28	2_3	46	1_2			0.035	99	6.67
IMT	3	1_2	29	1_2	46	1_2			0.035	99	6.72
IMT	3	1_2	30	1_2	46	1_2			0.034	99	6.66
IMT	3	1_2	31	1_2	41	1			0.052	10.4	7.93
IMT	3	1_2	41	1	42	1_2			0.052	10.4	7.94
IMT	3	1_2	41	1	46	1_2			0.034	99	6.65
IMT	3	1_2	43	2_3	46	1_2			0.035	99	6.67
IMT	3	1_2	44	1_2	46	1_2			0.035	99	6.67
IMT	3	1_2	42	1_2	47	2_3			0.038	99	7.33
IMT	3	1_2	46	1_2	49	1_2			0.035	99	6.66
IMT	4	1	7	1_2	28	1_2			0.054	10.5	8.04
IMT	4	1	28	1_2	40	1_2			0.055	10.7	8.27
IMT	4	2_3	25	1	40	1_2			0.043	99	8.2
IMT	6	1	7	1	20	1			0.036	99	6.65
IMT	7	1	37	3	45	1			0.037	99	7.05
IMT	11	3	20	3	32	1_2			0.05	99	9.29
IMT	11	1	35	1	38	3			0.05	99	9.19
IMT	11	1	38	3	40	1_2			0.05	99	9.29
IMT	17	1	36	1_2	37	3			0.039	99	7.18
IMT	17	1	37	3	48	1			0.04	99	7.3
IMT	17	2_3	28	1_2	40	1_2			0.039	99	7.26
IMT	20	3	22	1	24	2_3			0.059	11.3	8.74

[表8-2]

疾患	番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類	頻度	Odd比	Kai二乗値
IMT	20	3	24	2_3	33	1_2			0.054	10.7	8.24
IMT	20	3	24	2_3	38	1_2			0.053	10.2	7.8
IMT	20	3	24	2_3	48	1			0.059	11.5	8.97
IMT	17	1	20	3	32	1_2			0.049	99	9
IMT	20	3	32	1_2	40	1_2			0.067	13.3	10.67
IMT	20	3	32	1_2	38	3			0.037	99	6.9
IMT	21	1	28	1_2	40	1_2			0.052	10.2	7.78
IMT	11	1_2	25	1	38	3			0.059	11.1	8.55
IMT	17	1	25	1	38	3			0.04	99	7.24
IMT	23	1_2	25	1	38	3			0.039	99	7.13
IMT	25	1	36	1	38	3			0.046	99	8.55
IMT	25	1	38	3	40	1_2			0.065	12.4	9.85
IMT	28	1_2	32	3	40	1_2			0.053	10.1	7.7
IMT	7	1_2	28	1_2	33	1_2			0.044	99	8.4
IMT	28	1_2	38	2_3	40	1_2			0.053	10.2	7.77
IMT	31	3	32	3	47	1			0.043	99	8.19
IMT	4	1_2	31	3	45	2_3			0.054	10.5	8.02
IMT	15	1	31	3	45	2_3			0.046	99	8.91
IMT	31	3	45	2_3	46	1_2			0.035	99	6.64
IMT	34	3	36	1_2	39	1_2			0.038	99	7.06
IMT	34	3	37	1	47	1			0.036	99	6.66
IMT	17	1_2	34	3	39	1_2			0.037	99	6.77
IMT	34	3	39	1_2	41	1			0.04	99	7.55
IMT	34	3	39	1_2	45	1			0.04	99	7.58
IMT	16	1	34	1	40	1			0.035	99	6.7
IMT	18	1	34	1	40	1			0.036	99	6.64
IMT	24	1	34	1	40	1			0.039	99	7.29
IMT	34	1	40	1	45	1			0.036	99	6.73
IMT	12	1_2	39	1_2	43	3			0.036	99	6.68
IMT	1	2_3	11	3	31	2_3	39	1_2	0.039	99	7.28
IMT	2	1	7	3	20	3	38	3	0.049	99	8.76
IMT	2	1	25	1_2	38	3	39	1_2	0.043	99	7.54
IMT	2	1	33	2_3	38	3	39	1_2	0.041	99	7.4
IMT	2	1	11	3	31	2_3	39	1_2	0.038	99	6.64
IMT	2	1	35	1	38	3	39	1_2	0.042	99	7.5
IMT	4	2_3	20	3	33	1_2	40	1_2	0.045	99	8.68
IMT	4	2_3	23	3	33	1_2	40	1_2	0.055	10.8	8.32
IMT	4	2_3	33	1_2	40	1_2	47	1_2	0.059	99	11.49
IMT	4	2_3	11	3	20	3	40	1_2	0.037	99	6.93
IMT	4	2_3	20	3	31	2_3	40	1_2	0.035	99	6.77
IMT	4	2_3	29	1	38	3	40	1_2	0.036	99	6.67
IMT	5	1	11	3	39	1_2	43	3	0.053	10.1	7.65
IMT	5	1	12	1_2	20	3	23	3	0.048	99	8.83
IMT	5	1	15	1	20	3	32	1_2	0.054	10.4	7.99

[表8-3]

疾患	番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類	頻度	Odd比	Kai二乗値
IMT	5	1	20	3	23	3	31	3	0.038	99	7.25
IMT	5	1	20	3	37	2_3	39	1_2	0.063	12.5	9.92
IMT	5	1	12	1_2	25	1	44	1	0.037	99	6.68
IMT	5	1	25	1	39	1_2	45	1	0.035	99	6.65
IMT	6	1_2	11	3	37	2_3	39	1_2	0.038	99	6.99
IMT	6	1_2	11	3	39	1_2	43	3	0.043	99	7.97
IMT	6	1	15	1	17	3	25	1	0.037	99	6.73
IMT	6	1	17	3	33	1_2	40	1_2	0.06	11.5	8.97
IMT	6	1	11	3	20	1	42	1_2	0.043	99	7.95
IMT	6	1	20	1	23	3	40	1_2	0.036	99	6.77
IMT	6	2_3	9	1	22	2_3	25	1	0.039	99	7.08
IMT	6	2_3	22	2_3	25	1	42	1_2	0.042	99	7.65
IMT	6	2_3	20	3	25	1	46	1_2	0.052	99	9.83
IMT	7	3	9	1_2	20	3	38	3	0.054	99	10.03
IMT	7	3	13	3	20	3	38	3	0.05	99	9.47
IMT	7	3	14	3	20	3	38	3	0.053	99	10.09
IMT	7	3	20	3	22	1_2	38	3	0.053	99	9.45
IMT	7	3	20	3	23	3	38	3	0.046	99	8.55
IMT	7	3	20	3	27	3	38	3	0.055	99	10.35
IMT	7	3	20	3	29	1	38	3	0.042	99	7.57
IMT	7	3	20	3	30	1	38	3	0.053	99	10.07
IMT	7	3	20	3	33	1_2	40	1_2	0.062	99	12.11
IMT	7	3	20	3	35	1	38	3	0.046	99	8.58
IMT	7	3	20	3	38	3	49	1_2	0.053	99	10.04
IMT	7	2_3	17	2_3	33	1	40	1_2	0.036	99	6.68
IMT	9	1	12	1_2	34	3	36	1_2	0.042	99	7.44
IMT	9	1	20	3	31	3	36	1_2	0.048	99	9.13
IMT	9	1	31	3	33	1_2	40	1_2	0.045	99	8.61
IMT	9	1	12	1_2	24	1	34	3	0.039	99	6.93
IMT	9	1_2	25	1	39	1_2	45	1	0.04	99	7.56
IMT	9	1_2	25	1	39	1_2	46	1_2	0.038	99	7.21
IMT	11	3	16	1	31	2_3	39	1_2	0.038	99	7.29
IMT	11	3	17	1_2	31	2_3	39	1_2	0.042	99	7.78
IMT	11	3	18	1	31	2_3	39	1_2	0.036	99	6.73
IMT	11	3	22	1_2	31	2_3	39	1_2	0.045	99	8.1
IMT	11	3	23	2_3	31	2_3	39	1_2	0.039	99	7.26
IMT	11	3	31	2_3	36	1_2	39	1_2	0.041	99	7.66
IMT	11	3	39	1_2	42	1_2	43	3	0.045	99	8.42
IMT	11	3	39	1_2	43	3	47	1_2	0.042	99	7.87
IMT	12	1_2	20	3	23	3	36	1_2	0.048	99	8.76
IMT	12	1_2	23	3	32	1_2	41	1	0.039	99	7.05
IMT	12	1_2	40	1_2	42	1	47	1_2	0.041	99	7.63
IMT	12	1_2	25	1	34	1_2	44	1	0.046	99	8.16
IMT	13	3	25	1_2	38	3	39	1_2	0.041	99	7.64

[表8-4]

疾患	番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類	頻度	Odd比	Kai二乗値
IMT	13	3	36	1_2	38	3	39	1_2	0.042	99	7.99
IMT	13	3	38	3	39	1_2	43	3	0.044	99	8.15
IMT	14	3	15	1	20	3	32	1_2	0.062	12.1	9.59
IMT	14	3	20	3	23	3	31	3	0.05	99	9.75
IMT	15	1	25	1	31	3	32	3	0.038	99	7.1
IMT	15	1	17	2_3	31	3	40	1_2	0.054	10.3	7.87
IMT	15	1	31	3	33	1_2	40	1_2	0.034	99	6.64
IMT	15	1	20	3	23	3	32	1_2	0.055	10.6	8.1
IMT	15	1	20	3	32	1_2	36	1_2	0.057	10.9	8.43
IMT	17	1	20	3	25	1	31	2_3	0.039	99	7.28
IMT	20	3	23	3	31	3	32	3	0.04	99	7.58
IMT	20	3	23	3	31	3	38	2_3	0.039	99	7.19
IMT	20	2_3	28	1_2	40	1_2	42	2_3	0.041	99	7.79
IMT	20	3	28	1_2	29	1	46	2_3	0.036	99	6.8
IMT	20	3	29	1	37	2_3	39	1_2	0.062	12.1	9.51
IMT	20	3	29	1	39	1_2	42	1_2	0.063	12.4	9.86
IMT	20	3	29	1	39	1_2	43	3	0.063	12.2	9.6
IMT	20	3	22	1	23	3	32	1_2	0.057	10.6	8.14
IMT	20	3	36	1_2	37	2_3	39	1_2	0.056	10.8	8.29
IMT	20	3	36	1_2	39	1_2	45	1	0.06	11.6	9.07
IMT	20	3	38	3	39	1_2	43	3	0.036	99	6.68
IMT	20	3	23	3	32	1_2	46	1_2	0.059	11.3	8.77
IMT	20	3	37	2_3	39	1_2	46	1_2	0.053	99	10.37
IMT	20	3	39	1_2	42	1_2	46	1_2	0.057	11.3	8.81
IMT	20	3	39	1_2	45	1	46	1_2	0.055	10.8	8.34
IMT	20	3	39	1_2	46	1_2	47	1_2	0.057	11.2	8.73
IMT	20	3	37	2_3	39	1_2	48	1	0.058	11.1	8.61
IMT	23	3	37	3	38	3	48	1	0.038	99	6.74
IMT	23	3	31	2_3	39	1_2	47	1_2	0.057	11.1	8.62
IMT	23	3	37	2_3	39	1_2	47	1_2	0.063	12.3	9.74
IMT	25	1	34	1_2	38	3	44	1	0.057	10.5	8.02
IMT	25	1	33	2_3	39	1_2	45	1	0.037	99	7.06
IMT	25	1	39	1_2	45	1	47	1_2	0.038	99	7.08
IMT	25	1	33	2_3	39	1_2	46	1_2	0.035	99	6.76
IMT	28	1_2	29	1	33	1_2	40	1_2	0.038	99	7.25
IMT	28	1_2	29	1	40	1_2	42	2_3	0.041	99	7.77
IMT	28	1_2	34	2_3	40	1_2	42	2_3	0.041	99	7.68
IMT	28	1_2	33	1_2	40	1_2	48	1	0.039	99	7.27
IMT	28	1_2	40	1_2	42	2_3	48	1	0.044	99	8.31
IMT	31	3	32	3	33	1_2	37	2_3	0.055	10.5	8
IMT	35	1	38	3	39	1_2	43	3	0.042	99	7.74
IMT	35	1	37	3	44	2_3	48	1	0.037	99	6.73
IMT	35	1	39	1_2	43	3	44	2_3	0.041	99	7.83
IMT	36	1	37	3	40	1_2	42	2_3	0.041	99	7.66



ここで、オッズ比 (O d d) とは、該当する事象が対照グループと比べどれだけ起こりやすいかの指標であり、オッズ比が 2 とはたとえば動脈硬化などが 2 倍起こりやすいことを示す。「オッズ比 9 9」のものは、対照グループにその事象が全く起こらないことを示している。カイ二乗値 (K a i) はその事象の起こる有意差をみる指標で、6. 6 3 5 以上は  $P < 0. 0 1$  に相当する。

1 遺伝子多型のみの解析 (4 9 x 4 = 1 9 6 遺伝子型) では、早期動脈硬化を説明しうる (O d d > 1 0 かつ K a i > 6. 6 3 5) となる遺伝子多型は検索した 4 9 種では存在しなかった。ここで、遺伝子多型の遺伝子型の分類の仕方として、例えば M P O (G 4 6 3 A) のように記載されている場合、左側の多型のホモ (G G) を遺伝子型 1 とし、ヘテロ (G A) を遺伝子型 2、右側の多型のホモ (A A) を遺伝子型 3 とし、遺伝子型 1、遺伝子型 1 と 2、遺伝子型 2 と 3、および、遺伝子型 3 という、4 つの分類について解析し、他の遺伝子多型の遺伝子型と組合せたときに、最低限正の有意差がでる分類を採用した。例えば前記遺伝子型 1 でも遺伝子型 1 と 2 でも有意性がでる場合にはより有意の方を採用した。

2 遺伝子多型の組合せを検索した (4 9 x 4 8 / 2 x 4 x 4 = 1 7 1 8 6 遺伝子多型セット) とき、早期動脈硬化との関連性を説明しうる O d d > 1 0 かつ K a i > 6. 6 3 5 となる動脈硬化関連遺伝子多型セット 1 セットが抽出され、早期動脈硬化例 4 3 7 例中 1 4 例がこの遺伝子多型セットで説明された。他方、非動脈硬化例 1 9 5 例中 1 例もこの遺伝子多型セットを認めなかった。また、グループの組合せは、a g であった。

3 遺伝子多型の組合せを検索した (4 9 x 4 8 x 4 7 / 6 x 4 x 4 x 4 < 5 0 0, 0 0 0 遺伝子多型セット) とき、早期動脈硬化との関連性を説明しうる O d d > 1 0 かつ K a i > 6. 6 3 5 となる動脈硬化関連遺伝子多型セットが 7 2 セット抽出され、早期動脈硬化例 4 3 7 例中 2 3 3 例がこの遺伝子多型セットで説明された。他方、非早期動脈硬化例 1 9 5 例中 1 4 例にのみこの遺伝子多型セットが認められた。なお、2 遺伝子多型の組合せですでに抽出された遺伝子多型セットを含むものについては 3 遺伝子多型の組合せでは抽出しなかった。ま

た、各グループの組合せでは、34組合せ中21組合せが前記(A)から(G)の各グループ1遺伝子多型のみが組み込まれていた。

4遺伝子多型の組合せを検索した(49x48x47x46/24x4x4x4x4<15, 000, 000遺伝子多型セット)とき、早期動脈硬化を説明しうる(Odd>10かつKai>6.635)となる動脈硬化関連遺伝子多型セット103セットが抽出され、早期動脈硬化例437例中283例が説明された。他方、非早期動脈硬化例195例中19例にのみこの遺伝子多型セットが認められた。なお、2および3遺伝子多型の組合せですでに抽出された遺伝子多型セットを含むものについては4遺伝子多型の組合せでは抽出しなかった。また、各グループの組合せでは、706組合せ中200組合せが前記(A)から(G)の各グループ1遺伝子多型のみが組み込まれていた。

早期動脈硬化例中の、動脈硬化関連遺伝子多型セットにより説明できる割合と、非早期動脈硬化例中の動脈硬化関連遺伝子多型セットをもっているにもかかわらず症状を起こさない割合とを図3に示す。図3からみると、複合遺伝子多型数は、5セットまでで平衡に達する可能性がある。従って、必要な遺伝子多型の組合せ数は3〜5ぐらいで充分である。

本発明によると、動脈硬化性疾患の発症しやすさや、進行しやすさ等を動脈硬化性疾患危険度として正確に判定でき、動脈硬化の予防および治療に利用できる動脈硬化性疾患危険度判定方法、該危険度の判定等に用いられる動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法、動脈硬化性疾患危険度測定方法、遺伝子多型検出方法、遺伝子マーカー、遺伝子多型分析用キット、動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイ、動脈硬化性疾患危険度判定装置および動脈硬化性疾患危険度判定プログラムを提供することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度に基づき、被験対象の該遺伝子多型の遺伝子型から、遺伝子多型による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程を含み、

前記複数の遺伝子多型の組合せの少なくとも一つが、該複数の遺伝子多型の組合せと、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有することを特徴とする動脈硬化性疾患危険度判定方法。

2. 複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度が、該組合せと頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有するか否かで設定される請求の範囲第1項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

3. 複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度が、該組合せと頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する頻度のオッズ比で設定される請求の範囲第1項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

4. 複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度が、頸動脈内膜中膜肥厚度増加量で設定される請求の範囲第1項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

5. 複数の遺伝子多型の、組合せが、下記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを含む請求の範囲第1項から第4項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

[表1-1]

番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類
3	1_2	46	1_2				
1	3	21	1	28	1_2		
1	3	28	1_2	29	1		
1	3	28	1_2	40	1_2		
1	3	28	1_2	34	2_3		
3	1_2	4	1	7	2_3		
3	1_2	7	2_3	17	1_2		
3	1_2	7	2_3	31	1_2		
3	1_2	7	2_3	34	1_2		
3	1_2	8	3	46	1_2		
3	1_2	9	1_2	46	1_2		
3	1_2	12	2_3	31	1_2		
3	1_2	12	2_3	46	1_2		
3	1_2	13	2_3	46	1_2		
3	1_2	14	2_3	46	1_2		
3	1_2	15	1_2	25	1_2		
3	1_2	15	1_2	46	1_2		
3	1_2	22	1_2	31	1_2		
3	1_2	24	1_2	46	1_2		
3	1_2	25	1_2	31	1_2		
3	1_2	26	3	46	1_2		
3	1_2	28	2_3	31	1_2		
3	1_2	28	2_3	46	1_2		
3	1_2	29	1_2	46	1_2		
3	1_2	30	1_2	46	1_2		
3	1_2	31	1_2	41	1		
3	1_2	41	1	42	1_2		
3	1_2	41	1	46	1_2		
3	1_2	43	2_3	46	1_2		
3	1_2	44	1_2	46	1_2		
3	1_2	42	1_2	47	2_3		
3	1_2	46	1_2	49	1_2		
4	1	7	1_2	28	1_2		
4	1	28	1_2	40	1_2		
4	2_3	25	1	40	1_2		
6	1	7	1	20	1		
7	1	37	3	45	1		
11	3	20	3	32	1_2		
11	1	35	1	38	3		
11	1	38	3	40	1_2		
17	1	36	1_2	37	3		
17	1	37	3	48	1		
17	2_3	28	1_2	40	1_2		
20	3	22	1	24	2_3		

[表1-2]

番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類
20	3	24	2_3	33	1_2		
20	3	24	2_3	38	1_2		
20	3	24	2_3	48	1		
17	1	20	3	32	1_2		
20	3	32	1_2	40	1_2		
20	3	32	1_2	38	3		
21	1	28	1_2	40	1_2		
11	1_2	25	1	38	3		
17	1	25	1	38	3		
23	1_2	25	1	38	3		
25	1	36	1	38	3		
25	1	38	3	40	1_2		
28	1_2	32	3	40	1_2		
7	1_2	28	1_2	33	1_2		
28	1_2	38	2_3	40	1_2		
31	3	32	3	47	1		
4	1_2	31	3	45	2_3		
15	1	31	3	45	2_3		
31	3	45	2_3	46	1_2		
34	3	36	1_2	39	1_2		
34	3	37	1	47	1		
17	1_2	34	3	39	1_2		
34	3	39	1_2	41	1		
34	3	39	1_2	45	1		
16	1	34	1	40	1		
18	1	34	1	40	1		
24	1	34	1	40	1		
34	1	40	1	45	1		
12	1_2	39	1_2	43	3		
1	2_3	11	3	31	2_3	39	1_2
2	1	7	3	20	3	38	3
2	1	25	1_2	38	3	39	1_2
2	1	33	2_3	38	3	39	1_2
2	1	11	3	31	2_3	39	1_2
2	1	35	1	38	3	39	1_2
4	2_3	20	3	33	1_2	40	1_2
4	2_3	23	3	33	1_2	40	1_2
4	2_3	33	1_2	40	1_2	47	1_2
4	2_3	11	3	20	3	40	1_2
4	2_3	20	3	31	2_3	40	1_2
4	2_3	29	1	38	3	40	1_2
5	1	11	3	39	1_2	43	3
5	1	12	1_2	20	3	23	3
5	1	15	1	20	3	32	1_2

[表1-3]

[illegible]

[表1-4]

番号	分類	番号	分類	番号	分類	番号	分類
13	3	36	1_2	38	3	39	1_2
13	3	38	3	39	1_2	43	3
14	3	15	1	20	3	32	1_2
14	3	20	3	23	3	31	3
15	1	25	1	31	3	32	3
15	1	17	2_3	31	3	40	1_2
15	1	31	3	33	1_2	40	1_2
15	1	20	3	23	3	32	1_2
15	1	20	3	32	1_2	36	1_2
17	1	20	3	25	1	31	2_3
20	3	23	3	31	3	32	3
20	3	23	3	31	3	38	2_3
20	2_3	28	1_2	40	1_2	42	2_3
20	3	28	1_2	29	1	46	2_3
20	3	29	1	37	2_3	39	1_2
20	3	29	1	39	1_2	42	1_2
20	3	29	1	39	1_2	43	3
20	3	22	1	23	3	32	1_2
20	3	36	1_2	37	2_3	39	1_2
20	3	36	1_2	39	1_2	45	1
20	3	38	3	39	1_2	43	3
20	3	23	3	32	1_2	46	1_2
20	3	37	2_3	39	1_2	46	1_2
20	3	39	1_2	42	1_2	46	1_2
20	3	39	1_2	45	1	46	1_2
20	3	39	1_2	46	1_2	47	1_2
20	3	37	2_3	39	1_2	48	1
23	3	37	3	38	3	48	1
23	3	31	2_3	39	1_2	47	1_2
23	3	37	2_3	39	1_2	47	1_2
25	1	34	1_2	38	3	44	1
25	1	33	2_3	39	1_2	45	1
25	1	39	1_2	45	1	47	1_2
25	1	33	2_3	39	1_2	46	1_2
28	1_2	29	1	33	1_2	40	1_2
28	1_2	29	1	40	1_2	42	2_3
28	1_2	34	2_3	40	1_2	42	2_3
28	1_2	33	1_2	40	1_2	48	1
28	1_2	40	1_2	42	2_3	48	1
31	3	32	3	33	1_2	37	2_3
35	1	38	3	39	1_2	43	3
35	1	37	3	44	2_3	48	1
35	1	39	1_2	43	3	44	2_3
36	1	37	3	40	1_2	42	2_3

表 1－1 から表 1－4 中、「番号」は下記表 2－1 から表 2－2 中の同一番号の遺伝子多型を表し、「分類」の番号は遺伝子多型の遺伝子型のうち、組合せの対象となった遺伝子型を表し、1 は表 2－1 から表 2－2 中の遺伝子多型名において左側に現される多型のホモを、2 はヘテロを、3 は、右側に現される多型のホモを現し、1 2 は前記 1 と 2 とをまとめた遺伝子型、2 3 は前記 2 と 3 とをまとめた遺伝子型を表す。



[表2-1]

多型 番号	遺伝子多型名	ref. SNP ID	文献 番号	配列 番号	遺伝子の Accession番号
1	Enos(T-786C)		1		GDB:209976
2	Enos (Glu298Asp)	rs1799983			
3	IRS-1(GLY971ARG)	rs1801278			
4	glycogen_synthase(M416V)		2		GDB:134184
5	p22phox(C242T)		3		GDB:125238
6	interleukin6(C-634G)	rs3087226			
7	TGF beta(T29C/Leu10Pro)		4		GDB:581114
8	TNF-alfa(g-308a)		25	1	GDB:1336833
9	mmp-9(C-1562T)		5		GDB:125224
10	MMP-12(A-82G)		6		GDB:266582
11	MCP-1(A-2518G)		7		GDB:125279
12	MPO(G-463A)		8		GDB:120192
13	fractalkine_receptor(V249I)	rs3732379			
14	CRP(G1059C)		26	4	GDB:119071
15	connexin37(C1019T)		21		GDB:127818
16	E-selectin(Ser128Arg)		9		GDB:120612
17	ICAM1(E469K)	rs5498			
18	E-selectin(G98T)		22		GDB:120612
19	Dopamine-D2receptor (Ser311Hys)	rs1801028			
20	ACE(I/D)		23		GDB:119840
21	AT2-receptor(a1166c)	rs1064536			
22	angiotensinogen(t704c)		10		GDB:118750
23	beta3 adrenoceptor(Trp64Arg)		27	3	GDB:203869
24	beta2 Adrenoreceptor(C79T)	rs1042714			
25	beta-adrenergic receptor(A46G)	rs4997			
26	HANP(T2238C)	rs5065			
27	GP1IbIIIa(C1565T)		24		
28	GP1a(A1648G)		11		
29	HPA-2(Thr145Met)		28	5	GDB:11510064

[表2-2]

多型 番号	遺伝子多型名	ref. SNP ID	文献 番号	配列 番号	遺伝子の Accession番号
30	GlycoproteinVI(Ser219Pro)	rs1613662			GDB:11500433
31	glycoproteinIa(C807T)		12		GDB:118806
32	Thrombomodulin(G-33A)		13		GDB:119613
33	FactorXII (C46T)	rs1801020			
34	alfa-Fib(Thr312Ala)		29	6	GDB:119129
35	beta Fib(C148T)		14		GDB:119130
36	PAI-1(4G/5G)		15		GDB:120297
37	MTHFR(C677T)	rs1801133			
38	ABCA1(G1051A)		16		GDB:305294
39	HUMPONA(MET55LEU)	rs854560			
40	PON1(Gly192Arg)	rs662			
41	PPAR_gamma(PRO12ALA)	rs1801282			
42	hepatic_lipase(C-480T)		17		GDB:119366
43	Apo E(Cys112Arg)		30	2	GDB:119691
44	microsomal triglyceride transfer protein (G-493T)		31	7	GDB:228961
45	lipoprotein lipase(Ser447STOP)	rs328			
46	Alfa_estrogen_receptor(PvuII in intron1)		18		GDB:119120
47	serotonin_2A_receptor(T102C)		19		
48	Glutamate-cystein ligase(C-588T)		32	8	GDB:132915
49	matrilyn promoter(A-181G)		20		

6. 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも少なくとも0.2 mm厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも150例の動脈硬化疾患例集団において、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せを有する例が30%以上となり、

少なくとも150例の非動脈硬化疾患例集団において、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せを有する例が15%以下となるように、

複数の遺伝子多型の組合せが選択される請求の範囲第1項から第5項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

7. 動脈硬化疾患例集団および非動脈硬化疾患例集団が、いずれも糖尿病患者であって、心筋梗塞病歴がない集団である請求の範囲第6項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

8. 複数の遺伝子多型の組合せが、2から5個の少なくともいずれかの遺伝子多型の組合せである請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

9. 複数の遺伝子多型の組合せが、少なくとも3個の遺伝子多型からなる請求の範囲第1項から第8項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

10. 複数の遺伝子多型の組合せが、下記のa)からf)のいずれかの群に属する少なくとも二つの遺伝子多型を含む請求の範囲第1項から第9項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) TNF- $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群
- f) IRS-1 遺伝子に関連する遺伝子多型群

- g) F A B P 2 遺伝子に関連する遺伝子多型群
  - h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
  - i) N A D P ・ N A D P H 酸化酵素 p 2 2 p h o x に関連する遺伝子多型群
  - j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素に関連する遺伝子多型群
  - k) 熱ショックタンパク質 7 0 - 1 に関連する遺伝子多型群
  - l) T G F -  $\beta$  1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- 1 1. 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型と、  
レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群、メチレンテトラヒドロ葉  
酸還元酵素 (M T H F R) に関連する遺伝子多型群、および、脂質に関連する遺  
伝子多型群の少なくともいずれかに属する遺伝子多型とを少なくとも含む請求の  
範囲第 1 0 項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。
- 1 2. 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型が、P  
A I - 1 遺伝子に関連する遺伝子多型である請求の範囲第 1 1 項に記載の動脈硬  
化性疾患危険度判定方法。
- 1 3. レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多  
型が、A C E 遺伝子に関連する遺伝子多型である請求の範囲第 1 1 項および第 1  
2 項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。
- 1 4. 脂質に関連する遺伝子多型群に属する遺伝子多型が、H U M P O M A 遺  
伝子に関連する遺伝子多型である請求の範囲第 1 2 項および第 1 3 項のいずれか  
に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。
- 1 5. 環境因子に固有の動脈硬化危険度に基づき、被験対象の該環境因子の情  
報から該環境因子による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程をさらに含む  
、請求の範囲第 1 項から第 1 4 項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定  
方法。
- 1 6. 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度に固有の動脈硬化危険度に基づき、被験対  
象の該頸動脈内膜中膜複合体肥厚度から頸動脈内膜中膜複合体肥厚度による動脈  
硬化危険度を決定する危険度決定工程をさらに含む請求の範囲第 1 項から第 1 5  
項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

17. 動脈硬化性疾患危険度判定方法が、複数の危険度決定工程を有し、該危険度決定工程ごとに求められる動脈硬化危険度を総合して動脈硬化性疾患危険度を算出する動脈硬化性疾患危険度算出工程を含む請求の範囲第1項から第16項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

18. 被験対象の複数の遺伝子多型の遺伝子型を検出する検出工程を、顕在化工程前にさらに含む請求の範囲第1項から第17項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

19. 被験対象の複数の遺伝子多型の遺伝子型を検出する検出工程と、複数の遺伝子多型の、組合せに固有の動脈硬化危険度に基づき、前記検出工程で検出された被験対象の遺伝子多型の遺伝子型から、遺伝子多型による動脈硬化危険度を決定する危険度決定工程とを含み、前記複数の遺伝子多型の少なくとも一の組合せが、該複数の遺伝子多型の組合せと、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有することを特徴とする動脈硬化性疾患危険度測定方法。

20. 被験対象の遺伝子多型のうち、動脈硬化関連遺伝子多型セットにかかる複数の遺伝子多型の遺伝子型を選択的に明らかにすることにより、該被験対象の遺伝子多型における動脈硬化関連遺伝子多型セットを顕在化させる顕在化工程を含み、

該動脈硬化関連遺伝子多型セットが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せであり、動脈硬化性疾患関連因子であることを特徴とする動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法。

21. 顕在化工程が、選択的に明らかにされた複数の遺伝子多型の遺伝子型が、動脈硬化関連遺伝子多型セットに該当するか否かにより表される請求の範囲第20項に記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法。

22. 顕在化工程が、選択的に明らかにされた複数の遺伝子多型の遺伝子型が、動脈硬化関連遺伝子多型セットに該当する場合に、動脈硬化関連遺伝子多型セットに固有の、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する頻度のオッズ比により表される請求の範囲第20項に記載の動脈硬化性疾患関連

因子顕在化方法。

23. 顕在化工程が、選択的に明らかにされた複数の遺伝子多型の遺伝子型が、動脈硬化関連遺伝子多型セットに該当する場合に、動脈硬化関連遺伝子多型セットに固有の頸動脈内膜中膜肥厚度増加量により表される請求の範囲第20項に記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法。

24. 動脈硬化関連遺伝子多型セットが、上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを含む請求の範囲第20項から第23項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法。

25. 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも少なくとも0.2mm厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも150例の動脈硬化疾患例集団において、少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを有する例が30%以上となり、

少なくとも150例の非動脈硬化疾患例集団において、少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを有する例が15%以下となるように、

動脈硬化関連遺伝子多型セットが選択される請求の範囲第20項から第24項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法。

26. 動脈硬化疾患例集団および非動脈硬化疾患例集団が、いずれも糖尿病患者であって、心筋梗塞病歴がない集団である請求の範囲第25項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定方法。

27. 動脈硬化関連遺伝子多型セットが、2から5個の少なくともいずれかの遺伝子多型からなる請求の範囲第20項から第26項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法。

28. 動脈硬化関連遺伝子多型セットが、少なくとも3個の遺伝子多型からなる請求の範囲第20項から第27項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法。

29. 動脈硬化関連遺伝子多型セットが、下記のa)から1)のいずれかの群に

属する少なくとも二つの遺伝子多型を含む請求の範囲第20項から第28項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) TNF- $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群
- f) IRS-1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- g) FABP2 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
- i) NADP・NADPH酸化酵素 p22phox に関連する遺伝子多型群
- j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素に関連する遺伝子多型群
- k) 熱ショックタンパク質70-1に関連する遺伝子多型群
- l) TGF- $\beta$ 1 遺伝子に関連する遺伝子多型群

30. 被験対象の複数の遺伝子多型の遺伝子型を検出する検出工程を顕在化工程前にさらに含む請求の範囲第20項から第29項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法。

31. 上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子多型について、被験対象の遺伝子型を検出する工程を含み、

検出結果が動脈硬化性疾患危険度判定のために用いられることを特徴とする遺伝子多型検出方法。

32. 上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子多型を含む遺伝子マーカー。

33. 上記表1-1から表1-4中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子の特異的に増幅し得るプライマー対あるいは遺伝子に特異的にハイブリダイ

ズし得る核酸プローブを含み、少なくとも一の表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットを検出することを特徴とする遺伝子多型分析用キット。

34. 動脈硬化関連遺伝子多型セットが少なくとも 3 個の遺伝子多型を含むものである請求の範囲第 33 項に記載の遺伝子多型分析用キット。

35. 表 2-1 から表 2-2 中に記載の遺伝子多型から選択された少なくとも 2 個の遺伝子多型の遺伝子多型検出用プライマーおよびプローブの少なくともいずれかを有し、

頚動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頚動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも 0.2 mm 以上厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも 150 例の動脈硬化疾患例集団において、該選択された遺伝子多型で構成され得る上記表 2-1 から表 2-2 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットにおける頚動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子型の組合せを少なくとも一つ有する例が 30% 以上となり、

少なくとも 150 例の非動脈硬化疾患例集団において、15% 以下となる請求の範囲第 33 項および第 34 項のいずれかに記載の遺伝子多型分析用キット。

36. 表 2-1 から表 2-2 中に記載の遺伝子多型から選択された少なくとも 2 個の遺伝子多型についての遺伝子多型検出用プライマーまたはプローブを有し、

頚動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頚動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも 0.2 mm 以上厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも 150 例の動脈硬化疾患例集団において、該選択された遺伝子多型で構成され得る上記表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットにおける頚動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子型の組合せを有する例が 50% 以上となり、

少なくとも 150 例の非動脈硬化疾患例集団において、15% 以下となる請求の



範囲第 3 3 項から第 3 5 項のいずれかに記載の遺伝子多型分析用キット。

37. 複数の遺伝子多型検出用プライマーまたはプローブが下記の a) から l) の互いに異なるいずれかの群に属する請求の範囲第 3 3 項から第 3 6 項のいずれかに記載の遺伝子多型分析用キット。

- a) レニン・アンジオテンシン系に関連する遺伝子多型群
- b) 血小板機能・凝固系に関連する遺伝子多型群
- c) 脂質に関連する遺伝子多型群
- d) 一酸化窒素合成酵素に関連する遺伝子多型群
- e) TNF- $\alpha$  遺伝子に関連する遺伝子多型群
- f) IRS-1 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- g) FABP2 遺伝子に関連する遺伝子多型群
- h) 筋グリコゲン合成酵素遺伝子に関連する遺伝子多型群
- i) NADP・NADPH酸化酵素 p22phox に関連する遺伝子多型群
- j) メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素に関連する遺伝子多型群
- k) 熱ショックタンパク質 70-1 に関連する遺伝子多型群
- l) TGF- $\beta$  1 遺伝子に関連する遺伝子多型群

38. 上記表 1-1 から表 1-4 中に記載の動脈硬化関連遺伝子多型セットのうちから選択される少なくとも一の動脈硬化関連遺伝子多型セットを構成する遺伝子多型の、遺伝子多型検出用プローブを有することを特徴とする動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイ。

39. コンピューターを利用した動脈硬化性疾患危険度判定装置であって、複数の遺伝子多型の、組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルと、

入力された、被験対象の複数の遺伝子多型の組合せと、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける複数の遺伝子多型の組合せとを照合し、一致する遺伝子多型の組合せがある場合に、該遺伝子多型の組合せに対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段とを有することを特徴とする動脈硬化性疾患危険度判定装置。

40. 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化され

た動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として1単位を対応させたものである請求の範囲第39項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置。

41. 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比を対応させたものである請求の範囲第39項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置。

42. 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加を対応させたものである請求の範囲第39項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置。

43. 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子多型の組合せであることが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比が一定以上であること、および、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の平均値に有意差があることの少なくともいずれかにより定義される請求の範囲第39項から第42項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置。

44. 環境因子の有無または数値と、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルと、

入力された、被験対象の環境因子の有無または数値と、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける環境因子の有無または数値とを照合し、該環境因子の有無または数値に対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段とをさらに有する請求の範囲第39項から第43項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置。

45. 動脈硬化性疾患危険度判定装置が複数の検出手段を有し、前記複数の検出手段から検出された複数の頸動脈危険度の加算値に基づき動脈硬化性疾患危険

度を判定する判定手段をさらに有する請求の範囲第39項から第44項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置。

46. 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度と、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルと、

入力された、被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度と、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける頸動脈内膜中膜複合体肥厚度とを照合し、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度に対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段とをさらに有する請求の範囲第39項から第45項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置。

47. 前記検出手段から検出された頸動脈危険度および複数の前記抽出手段から抽出された頸動脈危険度の加算値のいずれかと、入力された、被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との加算値に基づき動脈硬化性疾患危険度を判定する判定手段をさらに有する請求の範囲第39項から第46項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置。

48. 被験対象の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度を測定して、前記頸動脈内膜中膜複合体肥厚度を前記コンピューターに供給する血管膜圧測定手段を含む請求の範囲第39項から第47項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定装置。

49. 複数の遺伝子多型の、組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルをコンピューターに記憶させ、

該コンピューターを、入力された、被験対象の複数の遺伝子多型の組合せと、前記動脈硬化危険度データテーブルにおける複数の遺伝子多型の組合せとを照合し、一致する遺伝子多型の組合せがある場合に、該遺伝子多型の組合せに対応する該動脈硬化危険度を検出する検出手段として機能させることを特徴とする動脈硬化性疾患危険度判定プログラム。

50. 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として1単位を対応させたものである請求の範囲第49項に記載の動脈硬化性疾患危険度判

定プログラム。

5 1. 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する複数の遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比を対応させたものである請求の範囲第 4 9 項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定プログラム。

5 2. 複数の遺伝子多型の組合せと、動脈硬化危険度とが対応して一覧化された動脈硬化危険度データテーブルが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子多型の組合せに、動脈硬化危険度として頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の増加を対応させたものである請求の範囲第 4 9 項に記載の動脈硬化性疾患危険度判定プログラム。

5 3. 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有する遺伝子型の組合せであることが、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が正常範囲をこえる頻度のオッズ比が一定以上であること、および、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度の平均値に有意差があることの少なくともいずれかにより定義される請求の範囲第 4 9 項から第 5 2 項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定プログラム。

5 4. 頸動脈内膜中膜複合体肥厚度が、健常人の頸動脈内膜中膜複合体肥厚度平均よりも少なくとも 0. 2 mm 厚い場合を動脈硬化疾患例と定義し、それ以外を非動脈硬化疾患例と定義した場合に、

少なくとも 1 5 0 例の動脈硬化疾患例集団において、動脈硬化危険度を少なくとも 1 単位有する例が 3 0 % 以上となり、

少なくとも 1 5 0 例の非動脈硬化疾患例集団において、動脈硬化危険度を少なくとも 1 単位有する例が 1 5 % 以下となる、

請求の範囲第 4 9 項から第 5 3 項のいずれかに記載の動脈硬化性疾患危険度判定プログラム。

図1

**\*TNF alfa G-308A (配列番号1)**

250

ACAGACCACAGACCTGGTCCCCAAAAGAAATGGAGGCAATAGGTTTGTAGGGGCA

308

TGGGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTVVTACACAC

250

ACAGACCACAGACCTGGTCCCCAAAAGAAATGGAGGCAATAGGTTTGTAGGGGCA

308

TGAGGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTVVTACACAC**APOLIPOPROTEIN E4 Cys112Arg (配列番号2)**

112Cys

53

72

CGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAG

112Arg

53

72

CGCGGACATGGAGGACGTGCGCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCGGCGAGGTGCAG**BETA 3 ADRENOCEPTOR Trp 64Arg (配列番号3)**

64Trp

266

302

GTGGGAGGCAACCTGCTGGTCATCGTGGCCATCGCTTGGACGCCAAGACTGCAGACCATGACCAACGT  
GTTTCGTG

64Arg

266

302

GTGGGAGGCAACCTGCTGGTCATCGTGGCCATCGCTCGGACGCCAAGACTGCAGACCATGACCAACGT  
GTTTCGTG**C-reactive protein 1059G/C (配列番号4)**

1059G

1030

1059

GAAATGTGAACATGTGGGACTTTGTGCTGTACCAGATGAGATTAAACACCATCTATCTTGGCGGGC

1059C

1030

1059

GAAATGTGAACATGTGGGACTTTGTGCTCTACCAGATGAGATTAAACACCATCTATCTTGGCGGGC

**Human platelet antigen-2 Thr 145Met (配列番号5)**

145Thr

501

524

GACCCTGCCCCCAGGGCTCCTGACGCCACACCCAAGCTGGAGAAGCTCAGTCTGGCTAACAACT  
TGACT

145Met

501

524

GACCCTGCCCCCAGGGCTCCTGATGCCACACCCAAGCTGGAGAAGCTCAGTCTGGCTAACAACT  
TGACT

**ALFA FIBRINOGEN Thr 312Ala (配列番号6)**

312Thr

1010

1031

GGGAGCTCTGGACCTGGAAGTACTGGAAGCTGGAAGCTCTGGGAGCTCTGGAAGT

312Ala

1010

1031

GGGAGCTCTGGACCTGGAAGTGCTGGAAGCTGGAAGCTCTGGGAGCTCTGGAAGT

**MICROSOMAL TRYGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN G-493T (配列番号7)**

-493G

-520

CTTTAACATTATTTTGAAGTGATTGGTGTGGTATGAATTAACAGTTTAAATTTAAATCCT

-493T

-520

CTTTAACATTATTTTGAAGTGATTGGTTTGGTATGAATTAACAGTTTAAATTTAAATCCT

**Glutamate-Cysteine Ligase Modifier subunit -588C/T (配列番号8)**

-588C

-620

-588

GGCGGCCGTGGGCGGAGCCGCGACCTGAACGCCGGGAGACCTCACCAGGCGGAGGCGGTGTCTACCTC  
AC

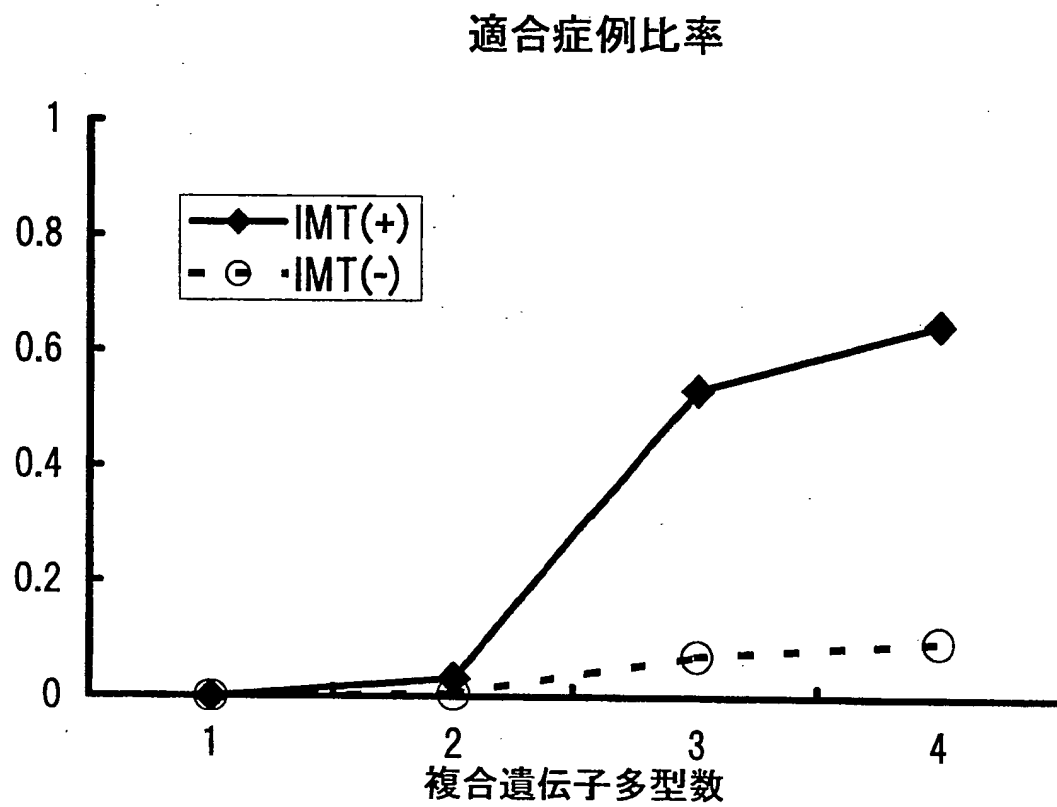
-588T

-620

-588

GGCGGCCGTGGGCGGAGCCGCGACCTGAACGCTGGGAGACCTCACCAGGCGGAGGCGGTGTCTACCTC  
AC

図3



# SEQUENCE LISTING

<110> Osaka Industrial Promotion Organization

<120> A method for prediction of the risk of  
arteriosclerotic disease

<130> OS00103P

<140>

<141>

<150> 2002-111132

<151> 2002-04-12

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 90

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

acagaccaca gacctggtcc ccaaaagaaa tggaggcaat aggttttgag gggcatgrgg 60

acgggggttca gcctccaggg tvvtacacac 90



<210> 2

<211> 55

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cgccggacatg gaggacgtgy gcggccgcct ggtgcagtag cgcggcgagg tgcag 55

<210> 3

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gtgggaggca acctgctggt catcgtggcc atcgtctyga cgccaagact gcagaccatg 60  
accaacgtgt tcgtg 75

<210> 4

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gaaatgtgaa catgtgggac tttgtgctst caccagatga gattaacacc atctatcttg 60  
gcgggc 66

<210> 5

<211> 73

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gaccctgccc ccagggctcc tgaygccac acccaagctg gagaagctca gtctggctaa 60  
caacaacttg act 73

<210> 6

<211> 54

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gggagctctg gacctggaag trctggaagc tggaactctg ggagctctgg aact 54

<210> 7

<211> 61

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ctttaacatt attttgaagt gattggtkgt ggtatgaatt aacagtttaa atttaaatcc 60  
t 61

<210> 8

<211> 70

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ggcggccgtg ggcggagccg cgacctgaac gcygggagac ctcaccaggc ggaggcgtg 60  
tctacctcac 70

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	YAMADA Y. et al., Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes., N.Engl.J.Med., 2002 December, 12;347(24):1916-23	1-54
A	YOSHIMURA M. et al., A T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary arterial vasomotility., Am.J.Cardiol., 15 March, 2000 (15.03.00), Vol.85, No.6, pages 710 to 714	1-54
A	Rauramaa R. et al., Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis., Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 2000 December, Vol.20, No.12, pages 2657 to 2662	1-54

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
08 August, 2003 (08.08.03)

Date of mailing of the international search report  
26 August, 2003 (26.08.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB03/01368

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chapman CM. et al., Polymorphisms in the angiotensinogen gene are associated with carotid intimal-medial thickening in females from a community-based population., Atherosclerosis., 2002 November, Vol.159, No.1, pages 209 to 217	1-54
A	McQuillan BM. et al., Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS), Circulation., 11 May, 1999 (11.05.99), Vol.99, No.18, pages 2383 to 2388	1-54
A	Terry JG. et al., Apolipoprotein E polymorphism is associated with segment-specific extracranial carotid artery intima-media thickening., Stroke., 1996 October, Vol.27, No.10, pages 1755 to 1759	1-54
A	Castellano M. et al., Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population., The Vobarno Study., Circulation., 01 June, 1995 (01.06.95), Vol.91, No.11, pages 2721 to 2724	1-54

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
(See extra sheet)

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Referral document 1

Rauramaa R. et al., Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 2000 Dec., Vol.20, No.12, pages 2657 to 2662

## Referral document 2

Chapman CM. et al., Polymorphisms in the angiotensinogen gene are associated with carotid intimal-medial thickening in females from a community-based population., *Atherosclerosis.*, 2001 Nov., Vol.159, No.1, pages 209 to 217

## Referral document 3

McQuillan BM. et al., Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS), *Circulation.*, 11 May, 1999 (11.05.99), Vol.99, No.18, pages 2383 to 2388

## Referral document 4

Terry JG. et al., Apolipoprotein E polymorphism is associated with segment-specific extracranial carotid artery intima-media thickening. *Stroke.* 1996 Oct., Vol.27, No.10, pages 1755 to 1759

## Referral document 5

Castellano M. et al., Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population., The Vobarno Study., *Circulation.*, 01 June, 1995 (01.06.95), Vol.91, No.11, pages 2721 to 2724

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The following inventions are claimed in the claims of this application.

Claims 1-18: method of judging the risk of arterial sclerosis,

Claim 19: method of measuring the risk of arterial sclerosis,

Claims 20-30: method of manifesting a factor associated with arterial sclerosis ("method of judging the risk" described at the end of claim 26 was judged as to be read "method of manifesting the associated factor"),

Claim 31: method of detecting genetic polymorphism,

Claim 32: gene marker,

Claims 33-37: kit for analysis of genetic polymorphism,

Claim 38: microarray for judging the risk of arterial sclerosis,

Claims 39-48: device for judging the risk of arterial sclerosis, and

Claims 49-54: program for judging the risk of arterial sclerosis.

On the other hand, the cited reference 1 describes a combination of a plurality of genetic polymorphisms having a significant positive association with a level of thickening of carotid intima/media composite and regarded as a factor associated with arterial sclerosis. Further, the cited references 2-5 describe genetic polymorphisms having a significant positive association with a level of thickening of carotid intima/media composite and capable of being a factor associated with arterial sclerosis. Still further, it was means publicly known by persons of ordinary skill in the art to which the invention pertains before the priority date of this application to, when a plurality of genetic polymorphisms associated with a disease are known, use a combination of such genetic polymorphisms in the detection and judgment of the disease.

Under these circumstances, simply "judging the risk of arterial sclerosis by means of a combination of a plurality of genetic polymorphisms having a significant positive association with a level of thickening of carotid intima/media composite" can be stated as having been known before the priority date of this application, and hence the genetic polymorphisms amounting to 49 types cannot be stated as having a technical relationship involving the same "special technical features" (herein the expression "special technical features" means those technical features that define a contribution which each of the inventions claimed in the claims, considered as a whole, makes over the prior art (if necessary, see Rule 13.2 of the Patent Cooperation Treaty)). Moreover, even if the whole contents of the description of this application are taken into consideration, any other "special technical features" cannot be ascertained nor presumed.

Therefore, the above 49 genetic polymorphisms cannot be stated as constituting a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

For the same reason, the 49 genetic polymorphisms concretely included in the inventions claimed in claim 19, claims 20-30, claim 31, claim 32, claims 33-37, claim 38, claims 39-48 and claims 49-54 cannot be stated as constituting a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Therefore, it appears that this application comprehends 49 inventions corresponding to the concretely described 49 genetic polymorphisms.

(continued to extra sheet)




# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB03/01368

Continuation of Box No.II-4 of continuation of first sheet(1)

Because any additional search fee has not been paid, an international search report is prepared only with respect to the invention employing the genetic polymorphism of polymorphism number 1 specified in Table 2-1 among the inventions claimed in claims 1-54.

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Int Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68</div>		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Int Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68</div>		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)</div>		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
参考文献の カテゴリー*	参考文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Yamada Y, et al., Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. N Engl J Med. 2002 Dec 12;347(24):1916-23	1 - 5 4
A	Yoshimura M, et al., A T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary arterial vasomotility. Am J Cardiol. 2000 Mar 15, vol.85, no.6, p.710-714	1 - 5 4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p> </div> </div>		
国際調査を完了した日 <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">08. 08. 03</div>	国際調査報告の発送日 <div style="text-align: right; margin-top: 5px; font-size: 1.2em;">26.08.03</div>	
国際調査機関の名称及びあて先 <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">           日本国特許庁 (ISA/J P)            郵便番号100-8915            東京都千代田区霞が関三丁目4番3号         </div>	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div>           特許庁審査官 (権限のある職員)            小暮 道明         </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> <span>4 B</span> <span>9 3 5 8</span> </div> </div> </div> <div style="margin-top: 5px;">           電話番号 03-3581-1101 内線 3448         </div>	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Rauramaa R, et al., Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Dec, vol.20, no.12, p.2657-2662	1-54
A	Chapman CM, et al., Polymorphisms in the angiotensinogen gene are associated with carotid intimal-medial thickening in females from a community-based population. Atherosclerosis. 2001 Nov, vol.159, no.1, p.209-217	1-54
A	McQuillan BM, et al., Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS) Circulation. 1999 May 11, vol.99, no.18, p.2383-2388	1-54
A	Terry JG, et al., Apolipoprotein E polymorphism is associated with segment-specific extracranial carotid artery intima-media thickening. Stroke. 1996 Oct, vol.27, no.10, p.1755-1759	1-54
A	Castellano M, et al, Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population. The Vobarno Study. Circulation. 1995 Jun 1, vol.91, no.11, p.2721-2724	1-54

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

PCT17条(2)(a)の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照。)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

(特別ページ参照。)

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 参考文献 1

Rauramaa R, et al., Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Dec, vol.20, no.12, p.2657-2662

## 参考文献 2

Chapman CM, et al., Polymorphisms in the angiotensinogen gene are associated with carotid intimal-medial thickening in females from a community-based population. Atherosclerosis. 2001 Nov, vol.159, no.1, p.209-217

## 参考文献 3

McQuillan BM, et al., Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS) Circulation. 1999 May 11, vol.99, no.18, p.2383-2388

## 参考文献 4

Terry JG, et al., Apolipoprotein E polymorphism is associated with segment-specific extracranial carotid artery intima-media thickening. Stroke. 1996 Oct, vol.27, no.10, p.1755-1759

## 参考文献 5

Castellano M, et al, Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population. The Vobarno Study. Circulation. 1995 Jun 1, vol.91, no.11, p.2721-2724

本願請求の範囲には、以下のような発明が記載されている。

請求の範囲 1 - 1.8 : 動脈硬化性疾患危険度判定方法

請求の範囲 1.9 : 動脈硬化性疾患危険度測定方法

請求の範囲 2.0 - 3.0 : 動脈硬化性疾患関連因子顕在化方法 (請求の範囲 2.6 末尾記載の「危険度判定方法」は「関連因子顕在化方法」の誤記と認定した。)

請求の範囲 3.1 : 遺伝子多型検出方法

請求の範囲 3.2 : 遺伝子マーカー

請求の範囲 3.3 - 3.7 : 遺伝子多型分析用キット

請求の範囲 3.8 : 動脈硬化性疾患危険度判定用マイクロアレイ

請求の範囲 3.9 - 4.8 : 動脈硬化性疾患危険度判定装置

請求の範囲 4.9 - 5.4 : 動脈硬化性疾患危険度判定プログラム

一方、参照文献 1 には、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有し、動脈硬化に関連する因子とされる複数の遺伝子多型の組合せが記載されている。また、参照文献 2-5 には、頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有し、動脈硬化に関連する因子となりうる遺伝子多型が記載されてる。さらに、ある疾患に関連した遺伝子多型が複数知られている場合に、それらの遺伝子多型を組み合わせることで該疾患の検出や判定に用いることは、本願優先日前から当業者の周知の手法であった。

してみると、単に「頸動脈内膜中膜複合体肥厚度との間に有意な正の関連性を有するような複数の遺伝子多型の組合せを用いて動脈硬化性疾患危険度を判定する」ことは、本願優先日前から公知であったといえるから、上述した 49 種類の遺伝子多型どうしは、同一の「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係を有しているものとはいえない。（なお、ここで言う、「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として「先行技術」に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである。（必要なら、特許協力条約に基づく規則 13.2 参照。））また、本願明細書の記載を参酌しても、それ以外の「特別な技術的特徴」の存在は確認も推認もできない。

よって、上述した 49 種類の遺伝子多型どうしは、単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとはいえない。

請求の範囲 19、請求の範囲 20-30、請求の範囲 31、請求の範囲 32、請求の範囲 33-37、請求の範囲 38、請求の範囲 39-48 及び請求の範囲 49-54 に記載された発明それぞれに具体的に包含される 49 種類の遺伝子多型どうしについても、上述と同様の理由により、単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとはいえない。

よって、この出願には、具体的に記載された 49 種類の遺伝子多型に対応した、49 個の発明が包含されているといえる。

そして、追加手数料が納付されなかったので、請求の範囲 1-54 に記載された発明のうち、[表 2-1] の多型番号 1 の遺伝子多型を用いる発明についてのみ国際調査報告を作成することとする。